

# **Elektrophysiologische Charakterisierung des Transporters für organische Kationen rOCT2**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

**chemische und pharmazeutische Wissenschaften**

der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

Thomas Budiman  
aus Zweibrücken

Frankfurt 2001

(D F 1)

vom Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Engels

1. Gutachter: PD Dr. Georg Nagel

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 17. Juli 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1 Transport von organischen Kationen in der Niere	7
1.2 Renale Membrantransporter für organische Kationen	10
1.3 Der Transporter für organische Kationen rOCT2	13
1.4 Das Xenopus-Expressionssystem	15
1.5 Elektrophysiologische Messmethoden	17
1.5.1 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	18
1.5.2 Die „giant patch clamp“-Technik	20
1.5.3 Die amperometrische Spannungsklemme	22
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	24
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte	25
2.2 Kultur- und Versuchslösungen	28
2.3 Heterologe Expression von rOCT2 in Xenopus-Oozyten	32
2.3.1 Haltung der Krallenfrösche	32
2.3.2 Laparotomie	32
2.3.3 Kollagenaseverdau	34
2.3.4 Auswahl geeigneter Oozyten für elektrophysiologische Experimente	35
2.3.5 Mikroinjektion der mRNA in die Oozyten	36
2.4 Elektrophysiologische Messmethoden	38
2.4.1 Durchführung von „voltage clamp“-Experimenten	38
2.4.2 Durchführung von Experimenten mit der „giant patch clamp“-Technik	39
2.4.3 Datenaufzeichnung und -analyse der „patch clamp“-Experimente	42
2.4.4 Durchführung von Experimenten mit der amperometrischen Spannungsklemme	43
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
3.1 Messungen an ganzen Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	46
3.1.1 Stimulation der Proteinkinasen A und C	46

3.1.2	Einfluss von extrazellulär zugeführten Hemmstoffen auf den elektrischen Strom	49
3.1.2.1	Extrazellulär zugeführte Schwermetalle	49
3.1.2.2	Einfluss der Inhibitoren TBA und Chinin auf den elektrischen Strom	50
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung von rOCT2 in „giant membrane patches“</b>	<b>52</b>
3.2.1	Einfluss von zytoplasmatisch zugeführten organischen Kationen auf den elektrischen Strom	52
3.2.1.1	Stimulation und Inhibierung von Auswärtsströmen	52
3.2.1.2	Signalabnahme während einer „patch clamp“-Messung	54
3.2.1.3	Substratabhängigkeit der Auswärtsströme	54
3.2.1.4	Kompetitive Hemmung durch zytoplasmatisch zugeführtes Chinin	56
3.2.1.5	Spannungsabhängigkeit der Auswärtsströme	59
3.2.1.6	Spannungsabhängigkeit der Hemmung durch Chinin	61
3.2.2	Einfluss von extrazellulär zugeführten organischen Kationen auf den elektrischen Strom	64
3.2.2.1	Substratabhängigkeit der Einwärtsströme bei Messungen in „outside out“-Konfiguration	65
3.2.2.2	Spannungsabhängigkeit der Einwärtsströme bei Messungen in „outside out“-Konfiguration	65
3.2.3	Strommessungen bei Vorbeladung der Pipette mit organischen Kationen	66
3.2.3.1	Trans-Inhibierung des Einstromes organischer Kationen von der zytoplasmatischen Seite	67
3.2.3.1.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Trans-Inhibierung	68
3.2.3.1.2	Anstiegszeit des elektrischen Stromes nach vorausgegangener Hemmung	69
3.2.3.2	Einfluss von Substrat-Konzentrationsgradienten auf den elektrischen Strom	70
3.2.3.2.1	Vorbeladung der Pipette mit Cholinchlorid	70
3.2.3.2.2	Vorbeladung der Pipette mit TMA-Cl	72
3.2.3.3	Spannungsabhängigkeit bei verschiedenen Substrat-Konzentrationsgradienten	73
3.2.3.3.1	Spannungsabhängigkeit bei Vorbeladung der Patchpipette mit Cholinchlorid	73
3.2.3.3.2	Spannungsabhängigkeit bei Vorbeladung der Patchpipette mit TMA-Cl	77
<b>3.3</b>	<b>Amperometrische Messungen an spannungsgeklemmten Oozyten</b>	<b>79</b>
3.3.1	Amperometrischer Nachweis des durch rOCT2 vermittelten Dopamintransports	79
3.3.1.1	Untersuchung von unspezifischen Redox-Strömen	79
3.3.1.2	Redox-Ströme von rOCT2 exprimierenden Oozyten nach Vorinkubation in Dopamin	81
3.3.2	Einfluss von extrazellulär zugeführtem Cholin auf den Dopamintransport	83
3.3.2.1	Potenzialabhängigkeit der Redox-Ströme	83
3.3.2.2	Abhängigkeit des Trans-Effekts von der intrazellulären Dopaminkonzentration	85
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>88</b>
<b>4.1</b>	<b>Wahl des Expressionssystems für die heterologe Expression von rOCT2</b>	<b>88</b>
<b>4.2</b>	<b>Eignung der „giant patch clamp“-Technik zur Untersuchung von rOCT2</b>	<b>90</b>
4.2.1	Vorteile und Grenzen der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ganzen Zellen	90
4.2.2	Vorteile der „patch clamp“-Methode	91

4.2.3	Vergleich der erwarteten und der gemessenen Ströme im Membranpatch	91
4.2.4	Eignung der „patch clamp“-Technik für zeitaufgelöste Relaxationsexperimente	92
4.2.5	Grenzen der „patch clamp“-Methode	93
4.2.6	Ursachen der Signalabnahme im isolierten Membranpatch	95
<b>4.3</b>	<b>Vergleich von zytoplasmatischen und extrazellulären Affinitäten</b>	<b>96</b>
4.3.1	Mechanistische Modelle für den rOCT2-vermittelten Transport von organischen Kationen	97
4.3.2	Inhibierung von rOCT2-vermittelten Strömen durch verschiedene Hemmstoffe	98
4.3.3	Charakterisierung der Inhibierung durch Chinin	101
<b>4.4</b>	<b>Vergleich der Strom-Spannungs-Kennlinien von Auswärts- und Einwärtsströmen</b>	<b>104</b>
4.4.1	I/U-Kennlinien von Auswärtsströmen	104
4.4.2	I/U-Kennlinien von Einwärtsströmen	105
4.4.3	Vergleich der I/U-Kennlinien von Auswärts- und Einwärtsströmen	105
4.4.4	Elektrochemisches Potenzial als treibende Kraft für den Transport von organischen Kationen	106
4.4.5	I/U-Kennlinien beim Austausch von organischen Kationen gegen organische Kationen	107
<b>4.5</b>	<b>Transstimulierbarkeit des Transports von organischen Kationen</b>	<b>111</b>
4.5.1	Amperometrischer Nachweis von rOCT2-vermitteltem Dopamintransport	111
4.5.2	Transstimulation des Dopaminausstroms durch Cholin	112
<b>4.6</b>	<b>Physiologische Rolle von rOCT2</b>	<b>115</b>
<b>4.7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>117</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER DISSERTATION</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>120</b>
	<b>HÄUFIG BENUTZTE SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN</b>	<b>127</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>129</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>130</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 *Transport von organischen Kationen in der Niere*

Organische Kationen sind organische Verbindungen, die permanent oder transient positiv geladen sind, also netto eine oder mehrere positive Ladungen tragen. Der Ladungszustand von transient geladenen organischen Verbindungen hängt meist vom pH-Wert des Mediums ab, in dem sie gelöst sind. Sie können deshalb sowohl kationisch (positiv geladen) als auch anionisch (negativ geladen) vorliegen. Viele toxische Substanzen wie zum Beispiel Paraquat und 1-Methyl-4-Phenylpyridinium und etwa fünfzig Prozent der in der Klinik gebräuchlichen Medikamente sind polare organische Verbindungen mit einem pK-Wert zwischen acht und zwölf, die bei physiologischem pH-Wert überwiegend in protonierter Form als Kationen vorliegen. Zu diesen Medikamenten zählen Antiarrhythmika wie Chinidin und Lidocain, Antihistamine wie Cimetidin, Analgetika wie Morphin und Methadon, Skelettmuskelrelaxantien wie Tubocurarin, sowie  $\beta$ -adrenerge Blocker. Die im menschlichen Körper vorkommenden (endogenen) kationischen Substanzen sind ebenso vielfältig; es seien Cholin, Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Histamin, Acetylcholin und N-Methylnikotinamid (NMN) genannt. Neben der endogenen Bildung dieser biologisch hoch wirksamen – essentiellen oder toxischen – organischen Kationen im Körper, der Aufnahme durch den Dünndarm, dem Abbau in der Leber und der Ausscheidung durch Dünndarm und Leber, sind die Ausscheidung und auch die Wiederaufnahme der organischen Kationen durch die Nieren von großer Bedeutung für ihre Homöostase (Roch-Ramel *et al.* 1992; Koepsell 1998; Zhang *et al.* 1998).

Die Nieren haben hauptsächlich die Aufgabe, für den Körper giftige Substanzen und Abbauprodukte auszuschcheiden, nützliche Nährstoffe und Bausteine wie zum Beispiel Glukose und Aminosäuren zurückzuhalten und das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen sowie den Elektrolyt-Haushalt zu regulieren (Seldin und Giebisch 1992). Zur Vermeidung von übermäßigen Nährstoff-, Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten wird der Harn bei seiner Passage durch die Tubuli der Nieren stark aufkonzentriert. Um die Nierenfunktion aufrecht zu erhalten, sind die renalen Bürstensaum- oder Epithelialzellen mit einer Vielzahl von Ionenkanälen sowie aktiven und passiven Transportern ausgestattet. Die benötigte Energie wird durch die Na/K-ATPase bereitgestellt (Fendler *et al.* 1985; Jorgensen 1986; Doucet 1988). Einen Überblick über Transportvorgänge in der Niere findet man unter anderem bei Ullrich und Greger 1985; Pritchard

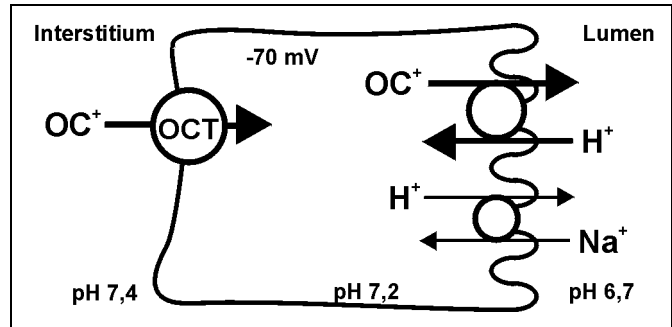
und Miller 1992; Roch-Ramel *et al.* 1992. Besonderes Augenmerk auf den Transport von organischen Kationen richten folgende Übersichtsartikel: Wright 1996; Pritchard und Miller 1997; Zhang *et al.* 1998; Koepsell *et al.* 1999; Burckhardt und Wolff 2000; Inui *et al.* 2000. Den strukturellen Anforderungen an die transportierten Substrate widmet sich der Artikel Ullrich 1997.

Kationisch und anionisch vorliegende Metabolite, Medikamente und Gifte können auf zwei Wegen von den Nieren ausgeschieden oder zurückgewonnen werden: zum einen durch Ultrafiltration in den Glomeruli, zum anderen durch Sekretion und Reabsorption in den Nierentubuli. Um durch die Filtrationsbarriere in das Ultrafiltrat zu gelangen, müssen die organischen Ionen hydrophil sein und dürfen nicht an Plasmaproteine gebunden sein (Zhang *et al.* 1998). Die Sekretion und Reabsorption findet vor allem durch die Epithelialzellen der proximalen Nierentubuli statt, in geringerem Maße auch in den distalen Tubuli und den Sammelrohren (Acara und Rennick 1973; Acara *et al.* 1979; McKinney 1982; Schali *et al.* 1983; Bevan und Kinne 1990). Zu diesem Zweck exprimieren die Epithelialzellen verschiedene Typen von primär aktiven und passiven Transportproteinen, die in der Basolateral- und der Luminalmembran lokalisiert sind. Im Falle der Sekretion müssen die organischen Ionen dabei zunächst vom Blut über die Basolateralmembran in die Epithelialzellen gelangen und von dort über die apikale Luminal- oder Bürstensaummembran ins Tubulolumen abgegeben werden, bei der Reabsorption ist der Weg umgekehrt.

Das klassische System des Kationentransports in der Niere wurde erstmals 1947 von Sperber und von Rennick am Huhn beschrieben (Rennick *et al.* 1947; Sperber 1947). In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Untersuchungen an verschiedenen Spezies gemacht, die den Transport von organischen Ionen in der Niere, der Leber und im Darm betreffen. Als Modellsubstrate dienten unter anderem Tetraethylammonium (TEA) (Rennick *et al.* 1947), N-Methylnikotinamid (Peters 1960), Cholin (Acara und Rennick 1973), Chinin (Rennick 1981), 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP) und Katecholamine (Quebbemann und Rennick 1968). Zur Anwendung kamen experimentelle Techniken wie die Sperber-Technik (Sperber 1946), *in vivo* und *in vitro* Durchflussmessungen (*clearance techniques*) an intaktem Gewebe (Ullrich *et al.* 1966; Ullrich und Greger 1985; Levinsky und Lieberthal 1992), Mikroperfusions- und -punktionstechniken sowie „stop-flow“-Techniken, (Frick *et al.* 1965; Ullrich *et al.* 1966; Velazquez und Wright 1992), Gewebeschnitte (Holm 1977), primäre Zellkulturen wie LLC-PK<sub>1</sub> (Hull *et al.* 1976) und Vesikelpräparationen von luminalen und basolateralen Membranen (Inui *et al.* 1985). Für viele dieser Experimente wurden radioaktiv markierte Substanzen verwendet.



1980 stellten Holohan und Ross auf Grund von kinetischen Studien an isolierten und aufgereinigten Vesikeln von Bürstensaum- und Basolateralmembranen aus der Hundeniere unter Benutzung von radioaktiv markiertem NMN ein im Grunde heute noch gültiges Modell auf, wonach verschiedene organische



**Abb. 1.1-1 Transport von organischen Kationen in einer renalen Bürstensaumzelle.** OCT: diffusionserleichterndes Transportsystem für organische Kationen; OC<sup>+</sup>: organisches Kation.

Kationen (unter anderem NMN und TEA) in zwei Schritten von der Niere ausgeschieden werden (Holohan und Ross 1980; Holohan und Ross 1981). Ein basolateral lokalisiertes polyspezifisches Transportsystem erleichtert die Diffusion der organischen Kationen aus dem Blut in die Epithelialzellen (siehe Abb. 1.1-1). Der Transport ist elektrogen und nutzt das negative Potenzial von  $-70$  mV im Innern der Zellen als treibende Kraft aus. Vom Zellinneren aus gelangen die Kationen durch einen sekundär aktiven Transportmechanismus gegen das Membranpotenzial der Bürstensaummembran ins Tubuluslumen, entweder im Austausch gegen ein anderes organisches Kation oder gegen ein Proton. Der notwendige Protonengradient vom Urin (pH 6,7) zum Zytosol (pH 7,2) für den Betrieb eines Organische-Kationen/Protonen-Austauschers wird von einem luminalen Natrium/Protonen-Austauscher bereitgestellt (Holohan und Ross 1981), der in mehreren Isoformen im Nierengewebe vorkommt (Orlowski *et al.* 1992).

Die renalen Bürstensaumzellen können auch eine Reabsorption von organischen Kationen vermitteln, obwohl bei vielen Substanzen eine Nettosekretion vorliegt (Zhang *et al.* 1998). Insbesondere für Cholin wurde ein bidirektionaler Transport gefunden (Acara und Rennick 1973; Acara 1975; Acara *et al.* 1979). Die Richtung des Cholintransports ist von seiner freien Konzentration im Plasma und im Urin abhängig: bei Plasmakonzentrationen unter  $\sim 100$   $\mu$ M wird eine Nettoabsorption und bei Konzentrationen über  $\sim 100$   $\mu$ M eine Nettosekretion beobachtet (Bessegir *et al.* 1981). Da die freie Plasmakonzentration von Cholin in der Ratte, dem Kaninchen und dem Menschen in der Regel  $\sim 25$   $\mu$ M nicht überschreitet (Bligh 1952; Bessegir *et al.* 1981), wird Cholin in den proximalen Tubuli normalerweise reabsorbiert.

## 1.2 Renale Membrantransporter für organische Kationen

Das ursprünglich von Holohan und Ross vorgeschlagene zweischrittige Transportsystem wurde durch zahlreiche nachfolgende Arbeiten gestützt und erweitert. Kinetische und substratspezifische Unterschiede wiesen auf mindestens zwei basolaterale Transporter hin, die sättigbar, elektrogen und unabhängig von Natrium- oder Protonengradienten sind (Besseghir *et al.* 1990; Besseghir *et al.* 1990; Sokol und McKinney 1990). Neben einem diffusionserleichternden elektrogenen Transporter mit breiter Substratspezifität (Takano *et al.* 1984; Sokol und McKinney 1990; Katsura *et al.* 1993) wurden auch Anzeichen für einen davon verschiedenen Transporter für Paraquat gefunden (Groves *et al.* 1995). Auf Grund von Transstimulationsexperimenten wurde außerdem die Existenz eines basolateralen Austauschers für organische Kationen ( $\text{OC}^+/\text{OC}^+$ -Austauscher) vorgeschlagen (Holohan und Ross 1980; Sokol und McKinney 1990; Dantzer *et al.* 1991). Möglicherweise ist dieser Austauscher identisch mit dem oben genannten elektrogenen Transporter und repräsentiert lediglich einen anderen Arbeitsmodus von diesem (Sokol und McKinney 1990).

Auf luminaler Seite wurden mindestens fünf Transportertypen postuliert. Darunter sind drei Systeme für den Auswärtstransport der organischen Kationen entgegen dem elektrischen Membranpotenzial verantwortlich, nämlich zwei verschiedene Organische-Kationen/Protonen-Austauscher und P-Glycoprotein (auch *multidrug-resistance transporter* oder MDR-Transporter genannt). Der eine Austauscher ist selektiv für TEA und NMN und wurde schon vielfach beschrieben (Holohan und Ross 1980; Holohan und Ross 1981; Inui *et al.* 1985; Rafizadeh *et al.* 1986; Dantzer *et al.* 1989; David *et al.* 1995). Der andere ist selektiv für Guanidin und transportiert weder TEA noch NMN (Miyamoto *et al.* 1989; Chun *et al.* 1997). Beide Austauscher werden durch den über der Plasmamembran herrschenden pH-Gradienten getrieben (pH 7,2 intrazellulär und pH 6,7 im Urin). Das Adenosin-Triphosphat (ATP) hydrolysierende P-Glycoprotein spielt bei der Ausscheidung von relativ hydrophoben organischen Kationen eine Rolle (Ford und Hait 1990; Homolya *et al.* 1993; Dutt *et al.* 1994; Dudley und Brown 1996). Zwei luminale Systeme, die in Bürstensaumvesikeln von der Kaninchenniere gefunden wurden, dienen wahrscheinlich der Reabsorption von organischen Kationen. Das eine System wird durch Zugabe von ATP stimuliert und transportiert TEA (McKinney und Hosford 1993), das andere System ist ein spezifischer elektrogener Transporter für Cholin und analoge Substanzen (Wright *et al.* 1992; Ullrich und Rumrich 1996). Dieser Transporter ist auf luminaler Seite vermutlich hauptverantwortlich für die Nettoabsorption von Cholin.

Neben dem transepithelialen Transport kann in den proximalen Tubuluszellen auch eine Anreicherung von organischen Kationen stattfinden, die durch das negative intrazelluläre Potenzial begünstigt wird. Darüber hinaus besitzen intrazelluläre Organellen der Epithelialzellen die Fähigkeit, organische Kationen zu transportieren und anzuhäufen (Pritchard und Miller 1996). Es wurde eine ATP-abhängige Anreicherung von TEA in Endosomen beobachtet, die um das Zehn- bis Fünzfach über dem erwarteten Wert liegt, der bei passivem Transport durch das elektrochemische Potenzial von TEA gegeben ist (Pritchard *et al.* 1994). Welche Rolle die Speicherung der organischen Kationen für das gesamte Transportsystem spielt, ist noch nicht klar. Die Existenz eines exozytotischen Sekretionsweges wäre vorstellbar.

Mit der Erweiterung des Methodenspektrums um molekularbiologische und immunohistochemische Methoden wurden die Grundlagen zum Verständnis der Transportvorgänge auf molekularer Ebene gelegt. Ein entscheidender Durchbruch gelang Koepsell und Mitarbeitern 1994 mit der Klonierung des Transporters für organische Kationen 1 aus der Rattenniere (rOCT1) (Grundemann *et al.* 1994), dem ersten Vertreter einer schnell wachsenden Familie von Membranproteinen. Sie benutzten dabei die Methode der funktionellen Expressionsklonierung in *Xenopus*-Oozyten. Inzwischen wurden mittels Homologie-Klonierung über dreißig weitere Mitglieder dieser Familie aus verschiedenen Spezies wie Ratte, Maus, Mensch, Kaninchen, Schwein und Flunder sowie aus den Invertebraten *Drosophila melanogaster* und *Caenoraphditis elegans* geklont. Eine aktuelle Zusammenstellung findet man beispielsweise bei (Zhang *et al.* 1998; Koepsell *et al.* 1999; Burckhardt und Wolff 2000). Northern-blot-Analysen zeigten, dass sich das Vorkommen der Transportproteine nicht nur auf die Nieren, den Dünndarm und die Leber beschränkt, sondern dass sie auch in der Plazenta (Kekuda *et al.* 1998), dem Gehirn (Koepsell 1998), dem Auge (Rajan *et al.* 2000) und anderen Geweben exprimiert werden. Wichtige Vertreter der OCT-Familie sind die eng mit OCT1 verwandten elektrogenen Transporter OCT2 und OCT3, der pH-abhängige Transporter OCTN1 und der natriumabhängige Transporter OCTN2 sowie die Transporter für organische Anionen OAT1, OAT2 und OAT3.

Die Klonierung von Transportproteinen für organische Kationen ermöglichte ihre gezielte heterologe Expression in *Xenopus*-Oozyten (Grundemann *et al.* 1994) und in Säugerzellkulturen zur detaillierten Untersuchung mit Hilfe moderner biophysikalischer Methoden wie der Fluorimetrie (Mehrens *et al.* 2000) oder im Falle der elektrogenen Transporter mittels elektrophysiologischer Messungen (Busch *et al.* 1996; Nagel *et al.* 1997). Funktionelle Studien an

rOCT1 nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten und in HEK293-Zellen mit radioaktiv markierten Substanzen und mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme haben gezeigt, dass organische Kationen wie TEA, Cholin, Dopamin, NMN und MPP von rOCT1 und rOCT2 transportiert werden (Grundemann *et al.* 1994; Busch *et al.* 1996; Nagel *et al.* 1997; Arndt *et al.* 2001). Dieser Transport ist sättigbar, unabhängig von Natrium- und pH-Gradienten und durch Chinin hemmbar. Eine weitergehende Charakterisierung dieser Proteine ist notwendig, um ihre Rolle bei Transportvorgängen in der Niere aufzuklären.

### 1.3 Der Transporter für organische Kationen rOCT2

Nachdem 1994 der genetische Code des polyspezifischen Transporters für organische Kationen rOCT1 durch funktionelle Expressionsklonierung in *Xenopus*-Oozyten entschlüsselt worden war (Grundemann *et al.* 1994), konnte zwei Jahre später in der Rattenniere rOCT2, ein weiterer Vertreter der OCT-Familie, mittels Homologie-Klonierung isoliert werden (Busch *et al.* 1996; Okuda *et al.* 1996, *Genbank*-Einträge X98334 und D83044). Die isolierte cDNA von rOCT2 besteht aus 2205 Basenpaaren und kodiert ein Protein aus 593 Aminosäuren mit 67 Prozent Sequenzübereinstimmung zu rOCT1 (Okuda *et al.* 1996) und 81 Prozent zu hOCT2 (Gorboulev *et al.* 1997). Laut Hydrophobizitätsanalyse werden zwölf Transmembranhelizes vorhergesagt mit zytoplasmatisch liegenden N- und C-terminalen Enden und einer großen hydrophilen Schleife zwischen den Transmembrandomänen 1 und 2. Das Protein besitzt zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen, zwei mögliche Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C, eine für die Proteinkinase A und sechs für die Caseinkinase II (Arndt 2000). Im Gegensatz zu rOCT1 und hOCT2 beschränkt sich das Vorkommen von rOCT2 wahrscheinlich ausschließlich auf die Niere. Eine Gruppe fand jedoch unter Anwendung der reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auch in einzelnen Gehirnregionen mRNA von rOCT2 (Grundemann *et al.* 1997). Die zur Bestimmung der physiologischen Rolle des Transporters wichtige Lokalisation im Nierengewebe war lange Zeit unklar. Man kam zu widersprüchlichen Ergebnissen, die entweder auf eine Expression in der Basolateralmembran (Okuda *et al.* 1996) oder in der Apikalmembran hindeuteten (Grundemann *et al.* 1997). Die exakte Lokalisation konnte erst kürzlich unter Anwendung von In-situ-Hybridisierungstechniken, immunohistochemischen Methoden und konfokaler Mikroskopie mit einiger Sicherheit bestimmt werden (Urakami *et al.* 1998; Karch *et al.* 2000; Sugawara-Yokoo *et al.* 2000; Sweet *et al.* 2000). Demnach wird rOCT2 hauptsächlich in den Segmenten S2 und S3 der proximalen Nierentubuli exprimiert, und zwar ausschließlich basolateral und nicht luminal. Im Gegensatz zu rOCT1 und rOCT3 wurden bei rOCT2 neulich auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression festgestellt. Die Expression von rOCT2 in den Nieren ist bei männlichen Ratten signifikant höher als bei weiblichen (Urakami *et al.* 1999) und lässt sich durch Zugabe von Testosteron stimulieren (Urakami *et al.* 2000). Eine erste funktionelle Charakterisierung von rOCT2 wurde nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten mit Hilfe von Flussmessungen mit radioaktiv markiertem TEA durchgeführt (Okuda *et al.* 1996). Die Autoren konnten zeigen, dass TEA von rOCT2

unabhängig vom extrazellulären pH-Wert transportiert wird und dieser Transport durch Cimetidin, Procainamid und Chinidin hemmbar ist. Im Gegensatz dazu fanden Gründemann und Mitarbeiter 1997 einen pH-abhängigen TEA-Transport durch rOCT2 nach Expression in HEK293-Zellen (Gründemann *et al.* 1997). Trotz der fundierten Kenntnisse über die renalen Transportsysteme für organische Kationen, die bis Anfang der neunziger Jahre gesammelt worden waren, gelang es nicht, rOCT2 eindeutig mit einem dieser Systeme zu identifizieren. Detaillierte funktionelle Studien unter Anwendung differenzierter und weitentwickelter Methoden sind notwendig, um die physiologische Rolle von rOCT2 zu bestimmen sowie seine Funktionsweise auf molekularer Ebene zu verstehen.

## 1.4 Das *Xenopus*-Expressionssystem

Ein geeignetes Expressionssystem für funktionelle Studien an Transportern für organische Kationen sollte hauptsächlich folgende Eigenschaften aufweisen: Das Expressionssystem sollte die Anwendung von elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden grundsätzlich ermöglichen, da beim Transport von organischen Kationen positive Ladung verschoben wird und eine Strommessung somit einen direkten Nachweis für den Transport darstellt. Um genügend hohe Ströme zu messen, müssten die Transporter-Proteine nach der Biosynthese in ausreichender Menge in die Plasmamembran der sie exprimierenden Zellen gelangen und dort auch funktional sein. Außerdem sollte die endogene Aufnahme von organischen Kationen sehr niedrig sein, um spezifische Effekte eindeutig dem heterolog exprimierten Transportprotein zuordnen zu können.

Das *Xenopus*-Expressionssystem stellt ein etabliertes Expressionssystem für Funktionsstudien von Membranproteinen wie Transportern, Kanälen und Pumpen dar, welches die geforderten Kriterien erfüllt (Marino 1996). Bei diesem System wird eine für ein zu exprimierendes Fremdprotein kodierende Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) in undifferenzierte, omnipotente Eizellen injiziert, die weiblichen Krallenfröschen der Art *Xenopus laevis* entnommen wurden. Dies wurde schon Anfang der siebziger Jahre erstmalig von Gurdon und Mitarbeitern (Gurdon *et al.* 1971) durchgeführt. An Stelle von mRNA kann man auch DNA direkt in den Zellkern injizieren. Das fremde Protein wird in beiden Fällen nach gewisser Zeit durch die überaus leistungsfähige zelluläre Maschinerie in großen Mengen prozessiert und in der lebenden Zelle exprimiert.

Die Vorteile der *Xenopus*-Oozyte gegenüber anderen Zellen sind vielfältig. Ihre Translationskapazität ist bedingt durch eine große Zahl an Ribosomen und Speicherproteinen sehr hoch (Taylor *et al.* 1985; Soreq und Seidman 1992), so dass man schon bei sparsamem Einsatz von mRNA hohe Proteinausbeuten erzielen kann. Schon die Injektion von 1 pg mRNA pro Oozyte führt zu detektierbaren Mengen an Protein. Für elektrophysiologische Messungen genügen oft 5-10 ng mRNA, die in 20-50 nl Wasser verdünnt in die Oozyten injiziert werden. Die eingesetzte mRNA und die exprimierte Proteinmenge sind nicht unbedingt proportional, eine Sättigung des Translationsapparates ist mit etwa 20 ng pro Oozyte erreicht (Colman 1984). Nach einmaliger Injektion von mRNA kann über einen Zeitraum von mehreren Tagen eine Steigerung der Expression beobachtet werden.

Ein weiterer Vorzug der *Xenopus*-Eizelle ist die Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, N-Glykosylierung, Hydroxylierung, Azetylierung) durchzuführen und die prozessierten Proteine in die richtigen Zellkompartimente zu befördern (Colman *et al.* 1984). Auch oligomere Proteine werden korrekt zusammengesetzt (Sumikawa *et al.* 1981; Soreq 1985). Diese Eigenschaften sind insbesondere für die funktionelle Expression von Membranproteinen von größter Bedeutung (Sigel 1990).

Die *Xenopus*-Oozyte ist in der Lage, Fremdproteine aus einer Vielzahl von Spezies zu exprimieren. Nicht nur Proteine von Vertebraten und Invertebraten, sondern auch pflanzliche (Van der Donk 1975; Miller und Zhou 2000) sowie virale und sogar archaebakterielle Proteine wie das Bacteriorhodopsin (Nagel *et al.* 1995) wurden schon funktionell exprimiert. Hori und Mitarbeiter konnten mittels Injektion von Poly(A)+ RNA aus der Rattenniere zeigen, dass sich das *Xenopus*-Expressionssystem auch zum Studium von Transportern für organische Kationen eignet (Hori *et al.* 1992). Mit diesem In-vivo-System können in Kombination mit elektrophysiologischen Methoden wie der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme oder der „patch clamp“-Technik besonders gut elektrogene Membranproteine wie zum Beispiel Ionenkanäle und Ionentransporter untersucht werden (Goldin 1991). So wurden die aus der Ratte klonierten Transporter für organische Kationen 1 und 2 (rOCT1 und rOCT2) zuerst im *Xenopus*-Expressionssystem exprimiert (Grundemann *et al.* 1994; Okuda *et al.* 1996).

Die Handhabung der Oozyten ist einfach. Bei ihrer Präparation und Lagerung sind keine sterilen Bedingungen notwendig. Durch ihre Größe von etwa 1 mm können leicht Injektionskapillaren in die Zellen eingestochen werden, um Injektate wie RNA, DNA oder *second messenger* zu verabreichen. Die Möglichkeit, in eine Oozyte gleichzeitig ein oder mehrere Mikroelektroden einzuführen, ist ein unschätzbarer Vorteil für Funktionsstudien an Membranproteinen wie Ionenkanälen, Rezeptoren oder Transportproteinen. So können zum Beispiel mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme und der „patch clamp“-Technik elektrophysiologische Parameter wie Membranpotenzial, Membranleitfähigkeit oder Membrankapazität gemessen und von Ionen verursachte elektrische Ströme über die Plasmamembran detektiert werden.



## 1.5 Elektrophysiologische Messmethoden

Elektrophysiologische Methoden sind zur Untersuchung von elektrogenen Membranproteinen besonders geeignet. Mit der Messung von elektrischen Strömen kann der Transport von Ionen oder die Verschiebung von elektrischer Ladung innerhalb eines Proteins direkt beobachtet werden. Dabei wird ausgenutzt, dass eine biologische Membran selbst eine sehr geringe Leitfähigkeit besitzt. In biologischen Systemen werden zur Messung und Injektion von elektrischen Strömen sowie zur Messung und Einstellung von Membranpotenzialen spezielle Elektroden benötigt, die eine Verbindung zwischen den intra- oder extrazellulären physiologischen Elektrolytlösungen einerseits und dem metallischen Leiter der Messapparatur andererseits gewährleisten. Am besten dazu geeignet ist die Silber/Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl-Elektrode) in einem sie umgebenden chloridreichen Medium, weil das Elektrodenpotenzial dieser Elektrode nur von der Aktivität der in Lösung befindlichen Chloridionen abhängig ist (Silber und Silberchlorid liegen als Festkörper vor). Physiologische Badlösungen werden meist über eine Salzbrücke mit einer solchen Elektrode niederohmig verbunden. Ist der Zugang zur physiologischen Lösung nicht ohne weiteres möglich, etwa bei intrazellulären Messungen oder „patch clamp“-Messungen, so verwendet man eine sogenannte Glaspipettenelektrode, in der die Ag/AgCl-Elektrode von einer mit Elektrolyt gefüllten Glaskapillare mit enger Öffnung umgeben ist, so dass der Austausch zwischen Elektrolyt und physiologischer Lösung gering bleibt.

Bei der Ableitung elektrischer Signale von biologischen Membranen ist es wichtig, die elektrischen Eigenschaften sämtlicher Komponenten des gesamten Systems zu kennen. Es ist hilfreich, sich diese anhand elektrischer Ersatzschaltbilder wie in Abb. 1.5–1 und Abb. 1.5–2 zu verdeutlichen. Die Plasmamembran einer Zelle hat neben einem geringen spezifischen Widerstand eine nicht zu vernachlässigende Kapazität ( $\sim 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) und reagiert deshalb elektrisch wie ein RC-Glied. Die Zelle selbst hat meist ein negatives Membranpotenzial (Ruhepotenzial), welches unter Energieaufwand aufrecht erhalten wird und sich wie eine Spannungsquelle verhält. Die Elektroden besitzen endliche Zugriffswiderstände, die zum Beispiel für Messungen an Ionenkanälen wie CFTR mit relativ hohen elektrischen Strömen von Bedeutung sind (Nagel *et al.* 2001). An Grenzschichten unterschiedlich zusammengesetzter Lösungen (zum Beispiel zwischen Pipetten- und Badlösung) können, bedingt durch unterschiedliche Ionenbeweglichkeiten der einzelnen Elektrolyte, sogenannte Übergangspotenziale (*liquid junction potentials*) auftreten. Schließlich können elektrogene

Membranproteine selbst als variable (zum Beispiel durch Inhibitoren herabsetzbare) Leitfähigkeiten für die von ihnen transportierten Ionensorten gesehen werden. Das durch die Nernstgleichung

$$U_S = R \cdot T \cdot (z \cdot F)^{-1} \cdot \ln\{[S]_o \cdot ([S]_i)^{-1}\} \quad (1)$$

mit der allgemeinen Gaskonstante  $R$ , der absoluten Temperatur  $T$ , der Valenz der transportierten Ionen  $z$ , der Faradaykonstante  $F$  sowie der extrazellulären und intrazellulären Konzentration der Substrationen  $[S]_o$  und  $[S]_i$  gegebene elektrochemische Potenzial  $U_S$  der transportierten Ionen stellt eine weitere, ionenspezifische Spannungsquelle dar. Membrantransporter besitzen oft eine relativ geringe Leitfähigkeit, was zu ebenso geringen Strömen führt. In diesen Fällen ist es besonders wichtig, unspezifische Leitfähigkeiten der Plasmamembran, wie sie etwa durch endogene Ionenkanäle verursacht werden, zu eliminieren.

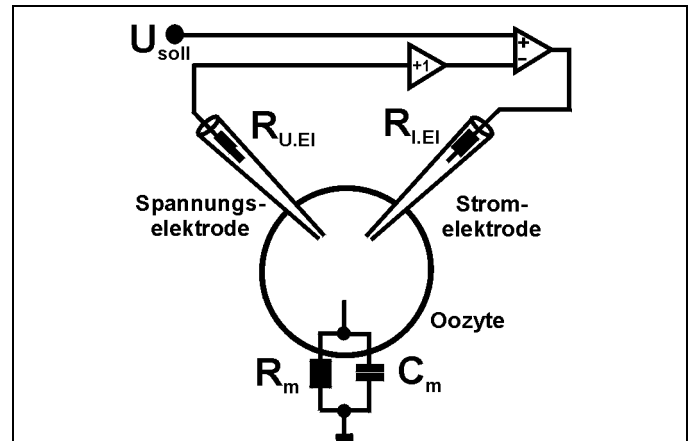
### 1.5.1 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Eine sehr etablierte und einfach zu handhabende elektrophysiologische Methode ist die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*two-electrode voltage clamp* oder kurz TEVC). Bei dieser Technik wird die Leitfähigkeit einer biologischen Membran bestimmt, indem der über die Membran fließende elektrische Strom (Transmembranstrom) bei konstant gehaltenem Membranpotenzial gemessen wird. Eine Messung in dieser Konfiguration ist gegenüber der Messung einer variablen Spannung bei konstantem Strom (Stromklemme oder *current clamp*) aus folgenden Gründen von Vorteil. Zum einen wird die Funktion vieler Membranproteine durch das Membranpotenzial beeinflusst oder sogar reguliert, so dass eine Messung bei wohldefiniertem Potenzial wünschenswert ist. Zum anderen werden bei Spannungsänderungen viele im System befindliche Kapazitäten wie die Membran- oder die Pipettenkapazität umgeladen, was zu einer Überlagerung des eigentlichen Mess-Signals mit den kapazitiven Strömen führt.

Das Prinzip der Spannungsklemme besteht darin, dass ein Regelkreis das Membranpotenzial  $U_m$  über die Injektion von Strom durch eine Stromelektrode auf einem konstanten Wert hält, der sogenannten Kommando- oder Sollspannung. Aus der ersten kirchhoffschen Regel (Ladungserhaltung) ergibt sich, dass der Pipettenstrom der Stromelektrode vom Betrag her gleich dem gesamten Transmembranstrom ist. Durch Aufzeichnung der zeitlichen Änderung des Pipettenstromes kann somit der sich ebenso ändernde Transmembranstrom  $I(t)$  direkt bestimmt werden und schließlich über die Beziehung

$$G(t) = (U_m)^{-1} \cdot I(t) \quad (2)$$

auch die Membranleitfähigkeit  $G(t)$ . Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus*-Oozyten werden zwei intrazelluläre und ein bis zwei<sup>1</sup> extrazelluläre Elektroden benutzt. Ein Ersatzschaltbild ist in Abb. 1.5–1 skizziert. Die extrazelluläre Elektrode wird als Badelektrode bezeichnet; sie legt die extrazelluläre Lösung auf Erdpotenzial und dient als Ableitung für



die über die Membran fließenden Ströme. Die sogenannte Spannungselektrode wird in die Oozyte eingestochen und misst die Spannung zwischen dem Zytoplasma und der Badelektrode. Im Idealfall entspricht die gemessene Spannung dem

**Abb. 1.5–1 Ersatzschaltbild für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.** Das mit der Spannungselektrode gemessene Membranpotenzial wird in einem Operationsverstärker mit der Sollspannung  $U_{\text{soll}}$  verglichen. Bei geklemmter Spannung wird die Differenz mit einem durch die Stromelektrode injizierten Strom ausgeglichen, der dem gesamten über die Membran fließenden Strom entspricht.  $R_{U,EI}$ ,  $R_{I,EI}$ : Widerstände der Spannungs- und Stromelektrode;  $R_m$ ,  $C_m$ : Membranwiderstand und -kapazität.

Membranpotenzial, jedoch können Serienwiderstände innerhalb der Zelle und an den Elektroden (zum Beispiel Öffnungswiderstand der Glaselektroden, Widerstand der Salzbrücke), die als Spannungsteiler wirken, Abweichungen hervorrufen.

Ein Operationsverstärker vergleicht die gemessene Spannung mit der Sollspannung, verstärkt die Differenz um einen Verstärkungsfaktor  $\mu$  und injiziert über die Stromelektrode einen dazu proportionalen Strom in die Oozyte, um den gemessenen Potenzialunterschied wieder auszugleichen (siehe Abb. 1.5–1). Es gilt folgende Beziehung zwischen geklemmter Spannung und Sollspannung:

$$U_{\text{klemm}} = U_{\text{soll}} \cdot \mu K \cdot (\mu K + 1)^{-1} \text{ mit } K = R_m \cdot (R_m + R_{I,EI})^{-1}, \quad (3)$$

wobei  $U_{\text{klemm}}$  die gemessene Klemmspannung,  $U_{\text{soll}}$  die Sollspannung,  $\mu$  der Verstärkungsfaktor des Operationsverstärkers,  $R_m$  der Membranwiderstand und  $R_{I,EI}$  der Widerstand der Stromelektrode ist (Sherman-Gold 1993). Für eine gute Spannungsklemme sollte

<sup>1</sup> Falls relativ hohe elektrische Ströme ( $> 10 \mu\text{A}$ ) erwartet werden wie bei der Messung von Ionenkanälen, müssen zwei Badelektroden verwendet werden, da sonst Fehler in der geklemmten Spannung wegen dem Auftreten eines zusätzlichen Serienwiderstandes entstehen. Im Falle der relativ kleinen Ströme der Transporter für organische Kationen ( $< 1 \mu\text{A}$ ) ist dieser Fehler vernachlässigbar und eine Badelektrode ausreichend.

das Produkt  $\mu K$  möglichst groß sein. Der Verstärkungsfaktor ist auf einen Wert zwischen  $10^2$  und  $10^5$  begrenzt, da es bei höheren Werten zu Oszillationen im Regelkreis kommen kann. Der Wert von  $K$  sollte mindestens 0,1 betragen. Dazu ist ein geringer Widerstand der Stromelektrode wünschenswert. Man kann diesen erzielen, indem man den Öffnungsdurchmesser der Glaspipette möglichst groß macht. In der Praxis sollte  $R_{I,El}$  zwischen 0,5 und 1  $M\Omega$  liegen. Daraus ergibt sich mit Gleichung (2), dass die Leitfähigkeit der Oozytenmembran 20  $\mu S$  nicht überschreiten sollte. Dies führt bei einer Klemmspannung von  $-40$  mV zu einem Strom von  $-800$  nA. Bei der Expression von Transportern für organische Kationen wird dieser Wert in der Regel nicht überschritten, wenn die Abdichtwiderstände an den intrazellulären Elektroden hoch sind und die Plasmamembran der Eizelle noch intakt ist. Man spricht dann von einer „dichten“ Oozyte.

Eine weitere wichtige Größe der Spannungsklemme ist die Zeitkonstante, mit der das System auf eine Änderung der Sollspannung oder der Membranleitfähigkeit reagiert. Die Kenntnis dieser ist bei der Aufnahme von Strom-Spannungs-Kennlinien unter Verwendung von Spannungsprotokollen mit schnellen Pulsen zu verschiedenen Membranpotenzialen wichtig und insbesondere bei zeitaufgelösten Messungen von Nicht-Gleichgewichtszuständen von entscheidender Bedeutung. Neben dem Widerstand der Stromelektrode und dem Verstärkungsfaktor ist vor allem die Membrankapazität  $C_m$  der Oozyte ein zeitlich limitierender Faktor, da Änderungen im Membranpotenzial zunächst zu einem Umladen der relativ großen Membrankapazität führen, bevor sich ein stabiles Potenzial aufbaut. Der Umladungsvorgang kann mit einer exponentiellen Funktion beschrieben werden, deren Zeitkonstante  $\tau$  durch den folgenden Ausdruck gegeben ist:

$$\tau = R_{I,El} \cdot C_m \cdot \mu^{-1}. \quad (4)$$

Mit den für ein „voltage clamp“-Experiment mit einer *Xenopus*-Oozyte typischen Werten  $R_{I,El} = 1$   $M\Omega$ ,  $C_m = 220$  nF und  $\mu = 10^3$  erhält man  $\tau = 220$   $\mu s$ . Dieser Wert ist für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme vernachlässigbar gering.

### 1.5.2 Die „giant patch clamp“-Technik

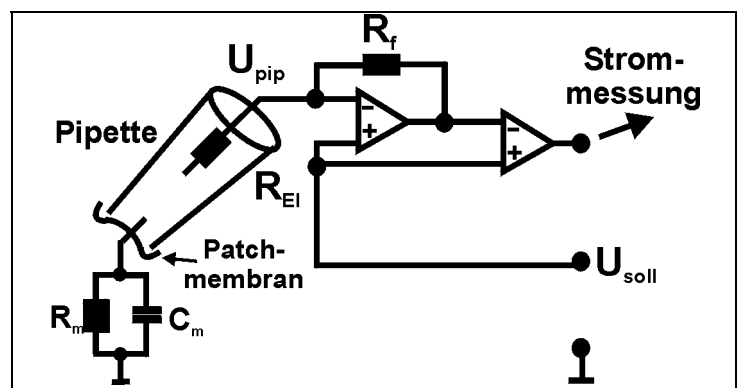
Will man die Funktion von Membranproteinen im Detail studieren, sind wohl definierte Versuchsbedingungen unverzichtbar. Die „patch clamp“-Technik, eine mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme verwandte elektrophysiologische Messmethode, gewährleistet durch die elektrische Isolierung und freie Zugänglichkeit eines Membranstückes (*membrane*

*patch*) eine gute Kontrolle über die Versuchsparameter. Dies wurde erstmals 1981 von Hamill *et al.* in einer viel beachteten Arbeit demonstriert (Hamill *et al.* 1981). Mit einer sogenannten Patchpipette, die Strom- und Spannungselektrode in einem ist, können in Kontakt mit der Plasmamembran einer Oozyte Abdichtwiderstände von 1 bis 10 G $\Omega$  erreicht werden. Da dieser Kontakt auch mechanisch relativ stabil ist, kann das von der Pipettenöffnung umgrenzte Membranstück aus der Plasmamembran herausgerissen werden und man erhält einen freien Membranpatch (*excised membrane patch*), dessen zytoplasmatische Seite für die Applikation von Badlösungen direkt zugänglich ist. Man nennt diese Messkonfiguration „inside out“-Konfiguration (kurz „i/o“-Konfiguration). Darüber hinaus treten in freien Patches seltener von endogenen mechanosensitiven Ionenkanälen (Methfessel *et al.* 1986) verursachte Hintergrundströme auf.

Man kann einen freien Membranpatch auch auf eine zweite Weise präparieren, indem der Patch unter der Pipette noch im Kontakt mit der Zelloberfläche durchbrochen wird und sich beim Abziehen mit umgekehrter Orientierung neu bildet. Man spricht dann von der „outside out“-Konfiguration („o/o“-Konfiguration). Durch geeignete Pipetten- und Badlösungen hat man die Kontrolle über beide Seiten der Plasmamembran.

Die „patch clamp“-Technik beruht wie die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme auf der Messung des Transmembranstromes bei gleichzeitiger Klemmung auf ein definiertes Potenzial. Bei der „patch clamp“-Technik erfolgt die Spannungsmessung und die Strominjektion jedoch mit ein und derselben Elektrode. Der dazu normalerweise verwendete Regelkreis ist in Abb. 1.5–2 skizziert. Ähnlich wie bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wird auch hier in einem Operationsverstärker die Differenz zwischen der Sollspannung und der

Pipettenspannung bestimmt. Der Eingangswiderstand des Operationsverstärkers ist dabei so hoch, dass die Messung praktisch stromlos erfolgt. Die Rückkopplung erfolgt über einen Rückkopplungswiderstand  $R_f$ , so dass der zum Ausgleich der Spannungsdifferenz in die Pipette fließende Strom zu einem



**Abb. 1.5–2 Ersatzschaltbild für die „patch clamp“-Technik.** Über den Rückkopplungswiderstand  $R_f$  fließt ein Strom, der die Differenz zwischen Pipettenspannung  $U_{pip}$  und Sollspannung  $U_{soll}$  ausgleicht. Die dabei an  $R_f$  abfallende Spannung ist proportional zum Transmembranstrom.

Spannungsabfall an  $R_f$  führt, der über einen zweiten Operationsverstärker mit der Sollspannung verglichen werden kann. Da der zunächst unbekannte Pipettenstrom in eine messbare Spannung transformiert wird, spricht man auch von einem Strom-Spannungs-Konverter.

Neben der freien Zugänglichkeit der Membran sind gute elektrische Eigenschaften ein weiterer Vorteil der „patch clamp“-Technik. Voraussetzung dafür ist allerdings ein hoher Abdichtwiderstand von über  $1\text{ G}\Omega$ , weil sonst Kurzschluss- oder Leckströme zwischen Pipetten- und Badlösung ein erhebliches thermisches Rauschen verursachen. Der relativ geringe Pipettenwiderstand von unter  $1\text{ M}\Omega$  erlaubt eine schnelle Spannungsklemme, die vorteilhaft für die Applikation von kurzen Spannungspulsen ist. Der limitierende Faktor ist hierbei die Pipettenkapazität, die für zeitaufgelöste Messungen verringert und kompensiert werden muss.

Die Untersuchung von elektrogenen Membrantransportern macht die Präparation von besonders großen Membranpatchen erforderlich. Im Gegensatz zu Ionenkanälen ist die von einem einzelnen Transporter translozierte Ladungsmenge pro Zeit mit einer Umsatzrate zwischen  $1$  und  $10^4\text{ s}^{-1}$  viel zu gering für Einzelmolekül-Messungen. Selbst bei konventionellen Makropatchmessungen mit Patchpipettendurchmessern von bis zu  $12\text{ }\mu\text{m}$  und ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der „makroskopischen“ Ströme von mehreren Transporterproteinen noch zu schlecht. Deshalb werden bei der sogenannten „giant patch clamp“-Technik Patchpipetten mit Öffnungsdurchmessern von  $20\text{-}30\text{ }\mu\text{m}$  verwendet, mit denen man „Riesen“-Membranstücke (*giant excised membrane patches*) mit einer Membrankapazität von  $2\text{-}15\text{ pF}$  und mehreren tausend Transportern isolieren kann (Hilgemann 1989; Hilgemann und Lu 1998). Die mit dieser Methode aufgezeichneten Ströme liegen meistens im Bereich von  $1\text{-}100\text{ pA}$ .

### **1.5.3 Die amperometrische Spannungsklemme**

Die bisher beschriebenen elektrophysiologischen Messmethoden beruhen auf einer direkten Messung von elektrischem Strom. Mit ihnen kann lediglich der gesamte Transmembranstrom aufgezeichnet werden, der sich aus der Summe aller in einer bestimmten Zeit durch eine Membranfläche gehenden positiven und negativen Ladungsträger zusammensetzt. Bei der Durchführung und Analyse von nicht-zeitaufgelösten Transstimulationsexperimenten ist es jedoch erforderlich, die Flüsse einzelner Ionensorten über die Membran zu unterscheiden. Die Erweiterung der elektrophysiologischen Messmethoden um eine ionenselektive Methode ist

daher wünschenswert. Man kann dazu die Transportfähigkeit von rOCT für Dopamin und andere Katecholamine ausnutzen (Busch *et al.* 1996). Diese können nämlich an einer Carbonfaser-Elektrode bei +0,55 V bis +0,7 V gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode selektiv oxidiert werden. Schon Ende der siebziger Jahre verwendeten Gonon *et al.* eine Carbonfaser-Elektrode, um die Freisetzung von Dopamin *in vivo* an narkotisierten Ratten elektrochemisch zu untersuchen (Gonon *et al.* 1978; Armstrong-James und Millar 1979; Gonon *et al.* 1980). Mittlerweile ist die Methode der Amperometrie, das heißt die elektrochemische Messung von Redox-Strömen mittels einer Carbonfaser-Elektrode, insbesondere in der Hirnforschung weit verbreitet. Die vielseitige Verwendbarkeit und einfache Handhabung der Carbonfaser-Elektroden eröffnet ihnen sehr breites Anwendungsfeld. Mit Hilfe von speziellen Beschichtungen der Elektrodenoberfläche kann die Selektivität einer Carbonfaser-Elektrode erheblich gesteigert und den jeweiligen Anforderungen angepasst werden. In der zyklischen Voltametrie können durch zeitliche Modulationen des Elektrodenpotenzials zusätzliche Informationen gewonnen werden.

Die Auswahl geeigneter Stoffe für einen direkten Nachweis mittels Amperometrie wird in wässrigen Medien und physiologischen Lösungen durch das Redox-Potenzial von Wasser bei +1 V (gegen eine Ag/AgCl-Referenz-Elektrode) und das von Sauerstoff bei -0,5 V beschränkt. Die leichte Oxidierbarkeit von Katecholaminen (Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin), Indolaminen (Serotonin, Melatonin und ihre primären Abbauprodukte), Ascorbinsäure und Eisen(II) bei Redox-Potenzialen unter +1 V ermöglicht ihre problemlose elektrochemische Detektion in physiologischen Lösungen. Die Empfindlichkeit des Nachweises ist sehr hoch: So kann Dopamin beispielsweise noch in Konzentrationen von 0,2 nM und Eisen(II) in 5 nM nachgewiesen werden. Beschichtet man eine Carbonfaser-Elektrode mit spezifischen Enzymen, lassen sich indirekt auch viele weitere Substanzen wie zum Beispiel Neurotransmitter, Glukose, Cholin und reduziertes Glutathion über Nebenprodukte der enzymatischen Reaktionen nachweisen.

Eine für diese Arbeit entwickelte spezielle Anwendung der Amperometrie ist die amperometrische Spannungsklemme. Sie dient zur simultanen Messung des Dopamin-Ausflusses und des elektrischen Transmembranstromes einer in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme befindlichen, rOCT2 exprimierenden und meist mit Dopamin vorbeladenen *Xenopus*-Oozyte. Hierbei wird eine Carbonfaser-Elektrode in direkten Kontakt mit der Zelloberfläche der spannungsgeklemmten Eizelle gebracht. Der Ausstrom von Dopamin kann mit dieser Methode bei verschiedenen Membranpotenzialen und in Abhängigkeit von zugeführten Substraten und Hemmstoffen gemessen werden.

## **1.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

Die 1994 geglückte Klonierung des Transporters für organische Kationen rOCT1 und die darauf folgende Isolierung weiterer homologer Klone der OCT-Familie eröffnete neue Möglichkeiten, um die Transportsysteme der Niere auf molekularer Ebene zu erforschen.

Das Ziel dieser Arbeit war die detaillierte elektrophysiologische Charakterisierung von einem Transporter der OCT-Familie als Modellsystem für den Transport von organischen Kationen. Wenn möglich, sollte auf Grund der gewonnenen Ergebnisse ein erstes Transportmodell aufgestellt werden, um zur Aufklärung der zu Grunde liegenden Transportmechanismen beizutragen. Mit Hilfe der konventionellen Zwei-Elektroden-Spannungsklemme und der für differenzierte Studien besonders geeigneten „patch clamp“-Technik sollten kinetische Studien mit spezifischen Modell-Substraten und -Inhibitoren durchgeführt werden. Als Studienobjekt wurde der aus der Rattenniere klonierte Transporter für organische Kationen rOCT2 ausgewählt, weil dieser in Vorversuchen nach Expression in *Xenopus*-Oozyten gegenüber rOCT1 deutlich höhere elektrische Ströme gezeigt hatte.

Wegen der in der Literatur diskutierten unklaren physiologischen Rolle von rOCT2 wurde im Laufe der Arbeit das Augenmerk verstärkt der Richtung des Stofftransports bei Cis- und bei Transstimulation zugewendet. Als weitere Aufgabenstellung kam deshalb die Entwicklung der amperometrischen Spannungsklemme als eine geeignete Methode zur Beobachtung von Substratflüssen bei geklemmtem Membranpotenzial hinzu.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

Die für diese Arbeit benutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle I und die verwendeten Chemikalien und Enzyme in Tabelle II aufgeführt. Die in Tabelle III aufgelisteten Computerprogramme zur Experimentsteuerung und Datenerfassung wurden auf Arbeitsplatzrechnern unter MS-DOS und die Programme zur Datenauswertung unter Microsoft Windows 98 installiert. In Abb. 2.1–1 werden Strukturformeln für einige der verwendeten Modellsubstrate und -hemmstoffe gezeigt.

**Tabelle I. Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Binokular	Wild M3Z	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Carbonfaser-Elektroden	CFN30-1000	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Carbonfaser-Verstärker	Micro C	World Precision Instruments, Sarasota, USA
CCD-s/w-Kamera	CCD-IRIS	Sony, Tokyo, Japan
Frequenzfilter	AP 255-S	Telemeter Elektronik, Donauwörth
Frequenzfilter	Modell 3323	Krohn-Hite, Avon, USA
Kaltlichtquelle	KL1500	Schott, Mainz
Mikroinjektionspipetten	3-00-203-G/X	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
Mikroinjektionspumpe	Drummond Nanoject	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
Mikromanipulator, fein	MM-203	Narishige Scientific Instr., Tokyo, Japan
Mikromanipulator, grob	Mikromanipulator M1	H. Saur, Reutlingen
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Osmometer	Mikro-Osmometer	Knauer, Berlin
Oszilloskop	HM 208	Hameg, Frankfurt
Patchpipetten	Borosilikat N-51A	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
"patch clamp"-Verstärker	Axopatch 200B	Axon Instruments, Union City, USA
"patch clamp"-Verstärker	EPC 7	List Medical, Darmstadt
Petrischalen mit Nocken	35,0/10 MM	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
pH-Meter	Piccolo plus	Hanna Instruments, Kehl
Pipetten	Finnpipette	Labsystems, Frankfurt
Pipettenschleifgerät	Modell 48000	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Pipettenziehgerät	PP-83	Narishige Scientific Instr., Tokyo, Japan
Pipettenziehgerät	Eigenbau	Werkstatt des MPI für Biophysik, Frankfurt
Vakuum-Pumpsystem	BVC 21	Vacuubrand, Wertheim
Ventile mit Steuerung	Valve Driver II	General Valve, Fairfield, NJ, USA
"voltage clamp"-Pipetten	Borosilikat GC150-15	Harvard Apparatus, Edenbridge, UK
"voltage clamp"-Verstärker	Turbo TEC-05	npi electronic, Tamm
y-t-Schreiber	BD112	Kipp & Zonen, Delft, Niederlande

**Tabelle II. Chemikalien und Enzyme**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure (MES)	Sigma, Deisenhofen
3-Aminobenzoessäure-Ethylester-Methansulfonat (Tricain)	Fluka, Neu-Ulm
3-Hydroxy-Tyraminhydrochlorid (Dopaminhydrochlorid)	Fluka, Neu-Ulm
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma, Deisenhofen
$\alpha$ -Tocopherolacetat (Vitamin-E-Acetate)	Sigma, Deisenhofen
Bariumchlorid	Merck, Darmstadt
Cadmiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Chininhydrochlorid	Fluka, Neu-Ulm
Cholinchlorid	Sigma, Deisenhofen
Cobalt(II)-Chlorid	Merck, Darmstadt
D(-)-N-Methylglucamin (NMG)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
D-Sorbitol	Fluka, Neu-Ulm
Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
Forskolin	Sigma, Deisenhofen
Gentamicinsulfat	ICN Biomedicals, USA
Glutathion (reduziert)	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase A aus Clostridium histolyticum	Sigma, Deisenhofen
leichtes weißes Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma, Deisenhofen
Penicillin G	Sigma, Deisenhofen
Phorbol ester (PMA)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen
Tetrabutylammoniumchlorid (TBA-Cl)	Sigma, Deisenhofen
Tetraethylammoniumchlorid (TEA-Cl)	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylammoniumchlorid (TMA-Cl)	Sigma, Deisenhofen
Tetrapropylammoniumchlorid (TPA-Cl)	Sigma, Deisenhofen
Tricain	Sandoz, Basel, Schweiz
Zinkchlorid	Sigma, Deisenhofen

**Tabelle III. Computersoftware**

<b>Programm</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Datenauswertung	ANA2	MFK, Niedernhausen
Datenauswertung	Excel 97	Microsoft, Redmond, WA, USA
Datenauswertung	Origin 5.0	Microcal, Northampton, MA, USA
Digitaler y-t-Schreiber	KAN1	MFK, Niedernhausen
Modellsimulation	Mathcad7	Mathsoft, Cambridge, WA, USA
„patch clamp“-Steuerung und -Aufzeichnung	ISO3	MFK, Niedernhausen
„voltage clamp“-Steuerung und -Aufzeichnung	ISO2	MFK, Niedernhausen

Sämtliche Programme sind auf Arbeitsplatzrechnern unter MS-DOS und Windows 98 installiert.

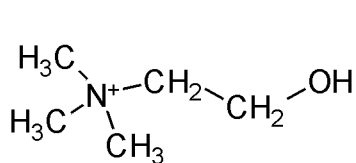
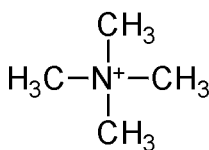
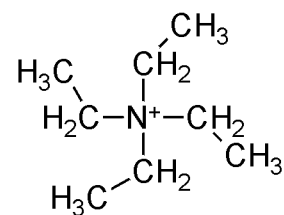
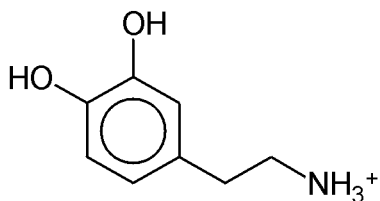
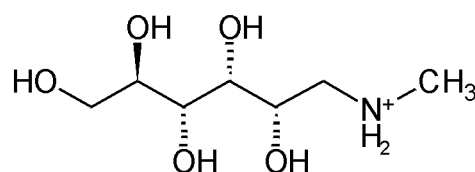
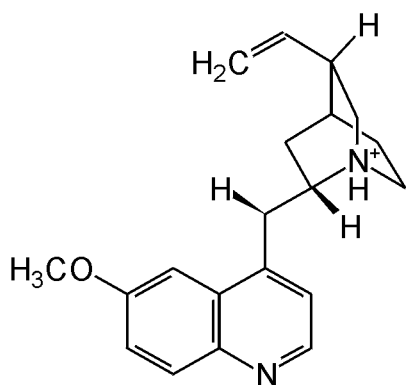
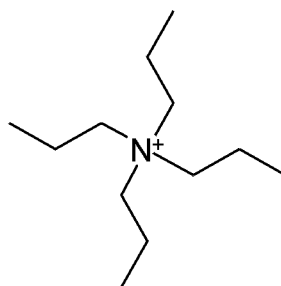
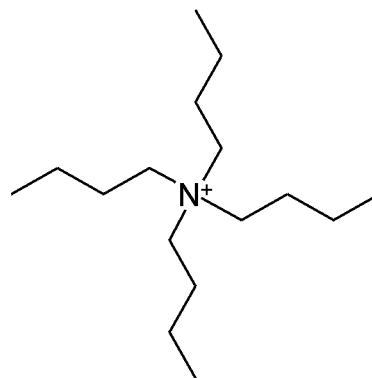
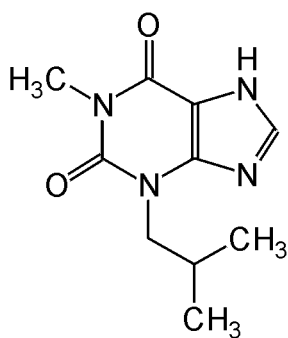
**Substrate:**Cholin<sup>+</sup>Tetramethylammonium<sup>+</sup>  
(TMA<sup>+</sup>)Tetraethylammonium<sup>+</sup>  
(TEA<sup>+</sup>)Dopamin<sup>+</sup>D(-)-N-Methylglucamin<sup>+</sup> (NMG<sup>+</sup>)**Inhibitoren:**Chinin<sup>+</sup>Tetrapropylammonium<sup>+</sup>  
(TPA<sup>+</sup>)Tetrabutylammonium<sup>+</sup>  
(TBA<sup>+</sup>)3-Isobutyl-1-Methylxanthin  
(IBMX)

Abb. 2.1–1 Strukturformeln verwendeter Substrate und Inhibitoren für rOCT2.

## 2.2 Kultur- und Versuchslösungen

In den Tabellen IVA-C sind die für die Experimente benutzten Lösungen und ihre Zusammensetzungen aufgeführt. Zur Lagerung der Oozyten wurde eine modifizierte Oozyten Ringer Lösung, ORi(Kult), verwendet. Diese Lösung wurde auch für die meisten „voltage clamp“-Experimente benutzt. Die Versuchslösungen ORi(NaCl), ORi(NMG) und ORi(Sorb) wurden in „voltage clamp“-Experimenten zur Untersuchung der Effekte von NMG beziehungsweise Sorbitol auf Oozyten verwendet, weil entsprechende Versuchslösungen für „patch clamp“-Experimente verwendet wurden. ORi(pH 6,5) und ORi(pH 8,5) wurden für Experimente zur pH-Abhängigkeit der Hemmung durch Quinin benutzt. Da die Lösung ORi(NaCl) neben Natrium-, Magnesium- und Chloridionen keine weiteren Ionen enthielt, wurde sie insbesondere für Experimente mit der amperometrischen Spannungsklemme verwendet. Dopaminhaltigen Lösungen wurde 1 mM Ascorbinsäure als Antioxidanz zugefügt, welche allein keinen Einfluss auf rOCT2-vermittelte Ströme hatte.

**Tabelle IV A. Lösungen für „voltage clamp“ und Amperometrie**

	ORi(Kult)	ORi(NaCl)	ORi(NMG)	ORi(Sorb)	ORi(pH6,5)	ORi(pH8,5)
pH	7,6	7,4	7,4	7,4	6,5	8,5
Sorbitol				190		
NMG			110			
NaCl	110	110			110	110
KCl	5				5	5
MgCl <sub>2</sub>	1	2	2	2	1	1
CaCl <sub>2</sub>	2				2	2
Substrat <sup>a</sup>	0-20	0-20	0-20	0-20	0-20	0-20
HEPES	5	10	10	10		5
MES					5	
NaOH <sup>b</sup>	~9,5	~4,5		~4,5	~3,5	~4,5
HCl <sup>b</sup>			~103			
Osmolarität <sup>c</sup>	~220	~219		~209	~220	~220

Sämtliche Konzentrationen in mM, Osmolarität in mosmol/l.

<sup>a</sup>als Chlorid-Salz; <sup>b</sup>zur pH-Titration; <sup>c</sup>ohne Substrat

Sämtliche Lösungen für „patch clamp“-Experimente enthielten 2 mM Magnesiumchlorid sowie zur pH-Pufferung HEPES oder MES. Wegen möglicher Kontamination der verwendeten Salze mit Kalzium enthielten alle Badlösungen zusätzlich 2,5 mM EGTA als Chelator für Kalziumionen, die als freie Ionen auf der zytoplasmatischen Seite schon bei Konzentrationen im Nanobereich endogene Chloridkanäle aktivieren könnten.

Magnesiumchlorid, HEPES, MES und EGTA hatten keine offensichtlichen direkten Effekte auf den durch rOCT2 verursachten Strom.

**Tabelle IV B. Pipetten-Lösungen für „patch clamp“**

	Pip(NMG)	Pip(Sorb1)	Pip(Sorb2)	Sym(pH7,4)	Sym(pH6,0)	Sym(pH8,5)
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	6,0	8,5
Sorbitol		190	170	170	170	170
NMG	100					
NaCl			10			
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2	2	2	2
BaCl <sub>2</sub>		2				
Ca-Gluconat			1			
EGTA				2,5	2,5	2,5
Substrat <sup>a</sup>				0-20	0-20	0-20
HEPES	10	10	10	10		10
MES					10	
NaOH <sup>b</sup>		~4	~4	~10,5	~9	~16,5
Osmolarität	~216	~218	~212	~195 <sup>c</sup>	~196 <sup>c</sup>	~205 <sup>c</sup>

Sämtliche Konzentrationen in mM, Osmolarität in mosmol/l.

<sup>a</sup>als Chlorid-Salz; <sup>b</sup>zur pH-Titration; <sup>c</sup>ohne Substrat

**Tabelle IV C. Bad-Lösungen für „patch clamp“**

	Bad(NMG)	Bad(Sorb)	Sym(pH7,4)	Sym(pH6,0)	Sym(pH8,5)
pH	7,4	7,4	7,4	6,0	8,5
Sorbitol		170	170	170	170
NMG	112,5-62,5	22,6			
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2	2	2
EGTA	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Glutathion	2,5				
Substrat <sup>a</sup>	0-50	0-20	0-20	0-20	0-20
HEPES	10	10	10		10
MES				10	
NaOH <sup>b</sup>			~10,5	~9	~16,5
HCl <sup>b</sup>	~98-49	~0,7			
Osmolarität	~210	~205 <sup>c</sup>	~195 <sup>c</sup>	~196 <sup>c</sup>	~205 <sup>c</sup>

Sämtliche Konzentrationen in mM, Osmolarität in mosmol/l.

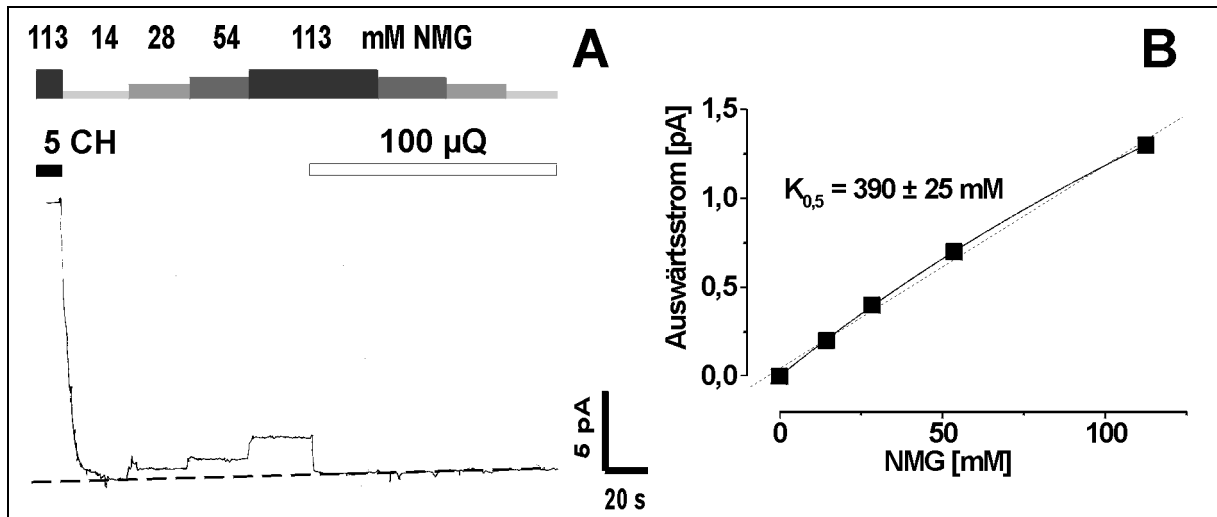
<sup>a</sup>als Chlorid-Salz; <sup>b</sup>zur pH-Titration; <sup>c</sup>ohne Substrat

Die geringe Signalthöhe (1-20 pA) in „patch clamp“-Experimenten erforderte eine sorgfältige Komposition der verwendeten Lösungen. Es wurden Pipetten- und Badlösungen auf Basis von Sorbitol oder NMG-Cl benutzt (siehe Tabellen IVA und B). Sorbitol erleichterte die Bildung von hohen Seal-Widerständen, ohne selbst mit rOCT2 zu wechselwirken, indem es die Leitfähigkeit der Oozytenmembran gegenüber den in „voltage clamp“-Experimenten oft verwendeten, auf Natriumchlorid basierenden Lösungen verminderte. Allerdings erhöhte die

Zufügung von geladenen Substanzen in hohen Konzentrationen wie Cholinchlorid die Ionenstärke der Lösung und führte so zu einer Zunahme der Leitfähigkeit und damit auch des Hintergrundstromes von nicht-injizierten Kontroll-Oozyten. Dies machte sich vor allem bei einem Lösungswechsel von substratfreier zu substrathaltiger Lösung etwa ab ~20 mM Substratkonzentration negativ bemerkbar.

Ein iso-osmolarer Austausch des Substrations gegen ein anderes Kation bei gleichbleibender Konzentration des Gegenions Chlorid konnte dem unerwünschten Effekt beim Lösungswechsel entgegenwirken. Natrium als Ersatzion hatte sich wegen einer Erhöhung der Leitfähigkeit der Patchmembran von nicht-injizierten Kontroll-Oozyten als untauglich erwiesen. Im Gegensatz dazu zeigte das permanent geladene NMG im Austausch gegen Cholin an Kontroll-Oozyten keine Effekte auf den elektrischen Strom. Deshalb wurden in Experimenten mit hohen Konzentrationen von organischen Kationen wie zum Beispiel in Abb. 3.2–5 die Lösungen Pip(NMG) und Bad(NMG) auf Basis von NMG-Cl benutzt und selbst zur Lösung Bad(Sorb) auf Basis von Sorbitol etwas NMG-Cl zugefügt. In den Lösungen auf Basis von NMG verringerte der iso-osmolare Austausch von NMG gegen andere organische Kationen bei gleichbleibender Konzentration des Gegenions Chlorid den Effekt auf die Leitfähigkeit von Kontroll-Oozyten. In mit rOCT2-cDNA injizierten Oozyten zeigten sich jedoch durch NMG verursachte Ströme, die mit Chinin gehemmt werden konnten. Die Höhe dieser Ströme war maximal fünfzehn Prozent (für 112 mM NMG) der durch 5 mM Cholin verursachten Ströme (siehe Abb. 2.2–1A), und eine Abschätzung der apparenten Bindungskonstante für NMG ergab einen Wert größer als 300 mM (siehe Abb. 2.2–1B). Der Umstand, dass NMG wahrscheinlich von rOCT2 transportiert wird, war für die durchgeführten Experimente vernachlässigbar.

In die Pipettenlösungen Pip(Sorb1) und Pip(Sorb2) wurde neben Magnesiumchlorid auch Bariumchlorid beziehungsweise Kalzium-Gluconat zur Förderung der Patchbildung zugefügt, es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Lösungen festgestellt werden. Die Lösungen Sym(pH 7,4), Sym(pH 6,0) und Sym(pH 8,5) wurden bei Experimenten mit Substratvorbeladung der Pipette sowohl als Pipetten- als auch als Badlösung benutzt, um möglichst symmetrische Bedingungen zu gewährleisten. Stark hydrophobe Substanzen wie Chinin wurden vor der Zugabe zu den Badlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, was in einer Endkonzentration von maximal 0,1 Prozent DMSO im Bad resultierte. In dieser Konzentration hatte DMSO selbst keinen Effekt auf elektrische Ströme im Patch.



**Abb. 2.2–1 Effekt von NMG auf den Strom einer mit 24 ng rOCT2-mRNA injizierten Oozyte.** **A:** Stromspur. Pipettenlösung: Pip(Sorb1); Badlösungen auf Bad(NMG) mit verschiedenen Konzentrationen NMG basierend. 10 CH: 10 mM Cholin; 100  $\mu$ Q: 100  $\mu$ M Chinin. **B:** Apparente Bindungskonstante für NMG. Durchgezogene Linie: Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung; gestrichelte Linie: Regressionsgerade.

## **2.3 Heterologe Expression von rOCT2 in Xenopus-Oozyten**

### **2.3.1 Haltung der Krallenfrösche**

Zur Gewinnung von Oozyten wurden lebende südafrikanische Krallenfrösche der Art *Xenopus laevis* verwendet, denen unter Narkose Ovarmaterial mittels eines Bauchschnitts (Laparotomie) entnommen wurde. Die Krallenfrösche wurden von H. Kähler, Hamburg und Nasco, Fort Atkinson, USA bezogen und in 200 Liter fassenden Kunststoff- oder Glasbecken gehalten. Die Becken waren mit jeweils 8 bis 12 Fröschen belegt. Jeweils zwei Tonröhren dienten den Tieren als Unterschlupf. Ein tröpfelnder Zulauf mit entgastem und aktivkohlegefiltertem Leitungswasser sowie eine ständig betriebene Aquarienpumpe für jedes Becken sorgten für eine ausreichende Wasserqualität. Das Wasser wurde mittels einer im Raum vorhandenen Klimaanlage auf 16-19 °C temperiert. Zeitschaltuhrbetriebene Leuchtstoff- und Glühlampen über den Becken gewährleisteten im sonst abgedunkelten Raum eine konstante Tageslänge. Einmal die Woche wurden die Tiere mit Trockenfutter oder Rinderherz und -leber gefüttert. Jedes Becken war mit einem eigenen Käscher ausgestattet, um die Gefahr einer Übertragung von möglichen Erregern von Becken zu Becken zu minimieren. Kranke Tiere wurden sofort in separate Quarantänebecken gesetzt und behandelt.

### **2.3.2 Laparotomie**

Der paarige Eierstock von weiblichen *Xenopus laevis* besteht aus bis zu 16 sackförmigen Mesovarien oder Loben, die vom äußeren Ovar epithel begrenzt werden und insgesamt bis zu 30.000 Oozyten der oözytären Entwicklungsstadien I-VI (Dumont 1972) beherbergen können. Die Oozyten sind vom Follikelepithel, der bindegewebigen Theka mit Fibroblasten und Blutkapillaren und dem einschichtigen inneren Ovar epithel umgeben. Durch einen Bauchschnitt (Laparotomie) konnten die Mesovarien ganz oder teilweise entnommen werden (Biopsie). Die Mesovarien wurden nicht ganz nahe am Ovarialstamm abgeschnitten, so dass sie sich nach der Organentnahme wieder schließen konnten. So begann eine langsame Regeneration des Eierstocks und einem Krallenfrosch konnten mehrere Male Loben entnommen werden. Bei Beschränkung der Laparotomie auf eine Seite des paarigen Eierstocks konnte der nächste Bauchschnitt schon vor Ablauf der Regenerationszeit auf der anderen Seite vorgenommen werden. Die hier gehaltenen Tiere wurden bis zu achtmal einer Laparotomie im Abstand von jeweils etwa 6 Monaten unterzogen.



### *Narkose*

Zur Betäubung vor dem Bauchschnitt wurde der Krallenfrosch zunächst für 5-10 Minuten in eine ~5 °C kalte 0,2%ige Tricainlösung (in Leitungswasser, pH 7,2) gelegt, einem häufig benutzten Narkotikum für Kaltblüter, das von den Fröschen über die Haut aufgenommen wird. Sobald der Frosch auch bei Berührung keinerlei Schwimmbewegungen mehr machte, wurde er aus dem Narkosebad genommen und gründlich unter fließendem Wasser abgewaschen, um das hautreizende Tricain vollständig zu entfernen. Der Eintritt der vollständigen Analgesie wurde mit dem Aussetzen des respiratorischen Schluckreflexes überprüft, indem der Frosch mit dem Finger in der Kehlgasse berührt wurde. Anschließend wurde der Frosch mit dem Rücken auf Eis gelegt, um durch die Abkühlung des Frosches die Narkosedauer zu verlängern und bei der Operation möglicherweise auftretende Blutungen schneller zu stillen.

### *Biopsie*

Die Organentnahme erfolgte im kaudalen Abdominalbereich, um den zentral im Tier liegenden Ovarialstamm zu schonen. Für die erstmalige Laparotomie wurde eine beliebige Bauchseite gewählt, für alle weiteren alternierend die linke oder rechte. Zuerst wurde die trockengetupfte Lederhaut mit einem trockenen Zellstofftuch zu einer Falte angehoben und parallel zur Körperachse mit einer feinen Schere auf ~8-12 mm Länge aufgeschnitten. Die darunter liegende Bauchmuskelschicht ist von einer Muskelfaszie bedeckt, die mit einer spitzen Pinzette vom Muskel abgehoben und auf der Länge der Öffnung in der Lederhaut aufgeschnitten wurde. Danach konnte der Muskel mit einer stumpfen Pinzette gefasst, leicht angehoben und ebenfalls aufgeschnitten werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine unter dem Muskel liegenden Eingeweide verletzt wurden. Durch das so entstandene Loch zum Bauchraum wurden nun mit der stumpfen Pinzette einzelne Mesovarien ergriffen, vorsichtig herausgezogen, ohne das Ovariepithel aufzureißen, körpernah abgeschnitten und in ORi(Kult) gelegt.

### *Wundvernähung*

Nach erfolgter Organentnahme wurde die Wunde mit zwei sich selbst verdauenden Fäden vernäht. Die Fäden wurden mit einer Rundnadel vom Bauchraum her zunächst durch den mit der Pinzette von den abdominalen Organen abgehobenen Muskel gezogen, wobei darauf zu achten war, dass auch in die Muskelfaszie eingestochen wurde. Dann wurde etwa 1-2 mm vom Wundrand entfernt mit der Nadel unter Zuhilfenahme der geschlossenen Pinzette als

Widerlager in die Lederhaut eingestochen und der Faden auch hier durchgezogen. Diese Prozedur wurde für vier Löcher durchgeführt. Danach wurden die Wundränder an den vier Fadenenden zusammengezogen und die Fäden mit jeweils zwei Doppelschlingen verknotet.

#### *Postoperative Versorgung*

Der Krallenfrosch wurde anschließend abgewaschen und zum Erwachen in einem Quarantänebecken auf ein feuchtes Zellstofftuch gesetzt. Das Becken wurde so weit mit Wasser gefüllt, dass die Nasenlöcher des Tieres noch an der Luft waren. Der Frosch wurde mit einem zweiten feuchten Zellstofftuch bedeckt, um eine Austrocknung zu verhindern. Nachdem der Frosch nach etwa ein bis vier Stunden erwacht war, wurde er vollständig gewässert und verblieb zur weiteren Beobachtung noch 3-4 Tage bei täglich zu wechselndem Wasser in Quarantäne. Nach dieser Zeit war die Wunde meist äußerlich gut verheilt; falls nicht, wurde das Tier mit 10 U/ml Penicillin G behandelt.

### **2.3.3 Kollagenaseverdau**

Zum Herauslösen der Oozyten aus den Mesovarien wurde das die Oozyten umgebende Bindegewebe enzymatisch mit Kollagenase verdaut. Dazu wurden ein bis mehrere Ovarlappen in eine Petrischale mit 10 ml ORi(Kult) oder 10 ml kalziumfreies ORi(Kult) und jeweils ein bis zwei mg/ml Kollagenase A (450 U/mg) gelegt und bei 18 °C unter langsamem Schütteln für etwa zwei bis fünf Stunden, manchmal auch über Nacht, inkubiert. Von Zeit zu Zeit wurde überprüft, ob die Oozyten bereits vereinzelt waren. Durch den Kollagenaseverdau wurde bei vielen Oozyten auch das sie umgebende Follikelepithel abgelöst, welches ohnehin vor elektrophysiologischen Messungen entfernt werden sollte. Damit die Oozyten nicht angegriffen wurden, wurden sie zum Abbruch des Verdaues etwa achtmal mit ORi(Kult) und zweimal mit ORi(Kult) plus Antibiotika (9,5 mg/l Penicillin und 10 mg/l Streptomycin) gewaschen. Das Waschen fand in einem Röhrchen mit 24 mm Durchmesser statt, um eine gute Trennung der leichteren Gewebetrümmer und unreifen Oozyten von den schwereren reifen Oozyten durch Sedimentation zu erreichen. Gewebetrümmer und unreife Oozyten konnten so bereits beim Waschen durch Absaugen entfernt werden. Nach dem Waschen wurden die Oozyten in eine ORi(Kult) plus Antibiotika enthaltende Petrischale mit 90 mm Durchmesser gegeben und weitere beschädigte Oozyten aussortiert.

### **2.3.4 Auswahl geeigneter Oozyten für elektrophysiologische Experimente**

Man unterscheidet je nach Entwicklungsstand und Morphologie 6 Stadien der in einem Ovar enthaltenen Oozyten (Dumont 1972). Ausgehend von der prä-vitellogenetischen Oozyte (Stadium I) mit transparentem Zytoplasma bildet die Oozyte während der Stadien II bis V große Mengen an ribosomalen Proteinen und lagert Reserveproteine und Nährstoffe ein. Dieser Vorgang wird Vitellogenese oder Dotterbildung genannt. Dabei wächst die Oozyte von 50-300 µm auf 1000-1200 µm an. Ab Stadium III bildet sich als stützendes Exoskelett die für alle essentiellen Nährstoffe penetrable Vitellinschicht. Die Plasmamembran bildet zahlreiche Mikrovilli aus und vergrößert dadurch die zum Aufnehmen von Speicherstoffen nötige Zelloberfläche um ein Vielfaches. Von Stadium IV an kommt es zu einer optisch durch eine unterschiedliche Pigmentierung erkennbare Differenzierung der Zelle in eine animale und eine vegetale Hälfte. Der animale Pol ist dunkel gefärbt und reich an Ribosomen und Mitochondrien. Der vegetale Pol mit gelblicher Färbung enthält vor allem Speicherorganellen und besitzt dadurch eine höhere Dichte. Mit dem Stadium V ist die Vitellogenese weitgehend abgeschlossen. Der Zellkern wandert in die animale Hemisphäre, und die Oozyte tritt in ein Ruhestadium ein. Durch Umweltreize wird der Übertritt ins laichfähige Stadium VI ausgelöst. Die Oozyte löst sich langsam aus dem sie umgebenden Follikelepithel, und es bildet sich eine pigmentfreie Zone zwischen den beiden Hemisphären aus. Bedingt durch einen Abbau der Mikrovilli der Plasmamembran durch Endozytose zeigt die Oozyte eine verminderte Aktivität membranärer Transportsysteme.

Die Auswahl der für elektrophysiologische Experimente geeigneten Oozyten des Stadiums V erfolgte unter einem Binokular nach folgenden Kriterien: Die Oozyten sollten einen Durchmesser von 1-1,2 mm besitzen und unbeschädigt sein; sie müssen nicht unbedingt völlig frei von Follikelepithel sein. Die Pigmentierung am animalen Pol muss homogen sein und darf keine Flecken aufweisen. Keinesfalls sollte sich ein unscharf begrenzter heller Fleck am animalen Pol zeigen, weil diese Oozyten durch Umwelteinflüsse wie große Temperaturschwankungen, mechanischer Stress oder die Kollagenasebehandlung ihren stabilen Ruhezustand verlassen haben und in kurzer Zeit absterben. Oozyten überdurchschnittliche Größe (1,2-1,3 mm) mit einem pigmentfreien äquatorialen Ring zwischen den animalen und vegetalen Hemisphären deuten auf das Stadium VI hin und sollten nicht verwendet werden. Mittels einer auf einen Innendurchmesser von ~2 mm an der Spitze abgebrochenen und feuerpolierten Pasteurpipette wurden je 20-25 ausgewählte

Oozyten auf Petrischalen (Durchmesser 35 mm) mit 4 ml ORi(Kult) plus Antibiotika verteilt. Eine solche Pipette wurde immer zur Handhabung der Oozyten verwendet. Bei täglicher Entfernung schadhafter Oozyten und Austausch der Kulturlösung alle zwei Tage waren die Oozyten in einem auf 16-18 °C temperierten Brutschrank bis zu einer Woche haltbar, wurden aber in der Regel am nächsten Tag injiziert.

### 2.3.5 Mikroinjektion der mRNA in die Oozyten

#### *Herstellung von mRNA*

Die für die Transporter für organische Kationen rOCT1 und rOCT2 kodierende cDNA wurde von Professor Dr. Hermann Koepsell, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt (Arndt 2000). Die cDNA war in die für das *Xenopus*-Expressionssystem geeigneten Plasmid-Vektoren pRSSP (für rOCT1) und pOG2 (für rOCT2) einkloniert, die zur Verbesserung der Expression flankierende, nicht-translatierte Sequenzen des *Xenopus*- $\beta$ -Globin-Gens enthalten (Grundemann *et al.* 1994; Busch *et al.* 1996). Für einen direkten Vergleich der Expression von rOCT1 und rOCT2 wurde rOCT2 von Frau Doris Ollig in pRSSP umklontiert. Die Expression von rOCT2 mit mRNA aus den Vektoren pOG2 und pRSSP zeigte keinen Unterschied, und beide Plasmide wurden zur Herstellung von mRNA für elektrophysiologische Experimente verwendet. Die zur Expression der Transporter für organische Kationen benötigte mRNA wurde freundlicherweise von Frau Doris Ollig mit Hilfe eines Kits (mMessagemachine-System, Ambion, Austin, USA) hergestellt. Dazu wurde die Plasmid-DNA zuerst mit den Restriktionsenzymen *Mlu I* (für pRSSP) und *Not I* (für pOG2) linearisiert und anschließend *in vitro* mit den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Bakteriophagen SP6 (für pRSSP) und T7 (für pOG2) transskribiert. Die mRNA wurde aufgereinigt, in RNase-freies Wasser aufgenommen und in Aliquots von 1-5  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff gelagert. Ihre Konzentration betrug zwischen 0,5 und 2  $\mu$ g/ $\mu$ l und wurde für die Injektion in Oozyten mit RNase-freiem Wasser auf 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt.

#### *Fertigung der Injektionskanülen*

Zunächst wurde eine aus Borosilikatglas bestehende Kanüle mit einem Pipettenziehgerät ausgezogen und an der Spitze zu einem Innendurchmesser von  $\sim 20 \mu$ m abgebrochen. Die Bruchkante sollte idealerweise schräg verlaufen und glatt sein, um die Oozyte beim Eindringen der Kanüle möglichst wenig zu verletzen. Die optische Kontrolle erfolgte unter einem normalen Lichtmikroskop. Weniger gut abgebrochene Kanülen wurden mit einem

Pipettenschleifgerät geschliffen und anschließend erst mit Chloroform, dann mit Alkohol und schließlich mit destilliertem Wasser gründlich von Schleifresten befreit. Die fertigen Injektionskanülen wurden im Trockenschrank für sechs Stunden bei 220 °C sterilisiert und für den späteren Gebrauch in einem geschlossenen Metallkästchen bis zu mehrere Monate gelagert. Meist wurden diese Arbeiten freundlicherweise von Frau Dagmar Stiegert übernommen.

#### *Injektion von mRNA in Oozyten*

Zur Injektion ausgewählte Oozyten wurden in eine mit ~1,5 mm breiten und tiefen Rillen versehene Halterung gesetzt, die in eine mit ORi(Kult) gefüllte Petrischale geklemmt war. Anschließend wurde die auf einen Mikromanipulator montierte Mikroinjektionspumpe zum Injizieren der mRNA vorbereitet. Dazu wurde eine Injektionskanüle luftblasenfrei mit leichtem Mineralöl von hinten befüllt und in die Mikroinjektionspumpe eingespannt. Hierbei war auf einen sicheren Halt und luftfreie Abdichtung zu achten. Der Stempel der Pumpe wurde bis ungefähr zur Mitte der Kanüle ausgefahren, um ausreichend Öl für die aufziehende mRNA, meistens ~1 µl, zu verdrängen. Die in flüssigem Stickstoff gelagerte, für die Transporter für organische Kationen kodierende mRNA wurde unmittelbar nach dem Auftauen mit der Mikroinjektionspumpe in die Injektionskanüle aufgenommen. Die mRNA wurde oft vor dem Aufziehen mit leichtem Mineralöl überschichtet, um sie vor Aufkonzentration durch Verdunstung oder möglicher Degradation durch Kontaminationen zu schützen. Zur Injektion wurde die Kanüle mit einem leichten Ruck in die Oozyte eingestochen und etwa 200-300 µm tief platziert. Das gewünschte Injektionsvolumen wurde an der Pumpe eingestellt (meist 20-50 nl entsprechend 10-25 ng mRNA) und die Injektion durch einen elektrischen Schalter ausgelöst. Um einen Druckausgleich in der Oozyte zu gewährleisten und ein Auslaufen von Eidotter und mRNA zu verhindern, wurde ~5-10 Sekunden gewartet, bevor die Kanüle aus der Oozyte herausgezogen und in die nächste eingestochen wurde. Für Kontroll-Experimente konnte einem Teil der Oozyten an Stelle der mRNA das gleiche Volumen an reinem Wasser injiziert werden, alternativ dienten dazu nicht-injizierte Kontroll-Oozyten. Jeweils fünf bis zehn injizierte Oozyten oder Kontroll-Oozyten wurden in eine Petrischale mit 4 ml ORi(Kult) plus Antibiotika (9,5 mg/l Penicillin und 10 mg/l Streptomycin) gesetzt und zur Expression im auf 16-18 °C temperierten Brutschrank für 4 bis 7 Tage inkubiert. Dabei wurden täglich schadhafte Oozyten entfernt und alle zwei Tage die Kulturlösung ausgetauscht. Etwa viermal im Jahr wurde kurzfristig zu dem Antibiotikum Gentamicin gewechselt, um der Bildung von resistenten Keimen vorzubeugen.

## 2.4 Elektrophysiologische Messmethoden

### 2.4.1 Durchführung von „voltage clamp“-Experimenten

Sämtliche Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurden an einem zu Beginn dieser Arbeit bereits existierenden Messplatz durchgeführt. Er besteht im Kern aus einem „voltage clamp“-Verstärker und einer Messkammer, in der eine *Xenopus*-Oozyte gehalten und mit Badlösung umspült werden kann. Da die Technik der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme allgemein bekannt ist, soll sie hier nur kurz beschrieben werden.

Eine Oozyte wurde zunächst mit Hilfe einer weitleumigen Pipette in die mit Badlösung gefüllte Kammer überführt. Mit einem Pipettenziehgerät (Eigenbau der Werkstatt) wurden zwei Mikropipetten auf  $\sim 1 \mu\text{m}$  Spitzendurchmesser ausgezogen und mit 3 M Kaliumchlorid-Lösung luftblasenfrei befüllt. Die Mikropipetten wurden über chlorierte Silberdraht-Elektroden auf Elektrodenhalter gesteckt, die jeweils an einem Mikromanipulator (Typ M1, H. Saur, Reutlingen) befestigt waren. Die Erdungselektrode wurde über eine Salzbrücke mit dem Bad verbunden. Der Widerstand der beiden Elektroden wurde im Bad kontrolliert und sollte für die Stromelektrode unter  $1 \text{ M}\Omega$  betragen. Unter einem Binokular (Wild, Herbrugg, Schweiz) wurden die Elektroden mit einem kurzen Impuls auf die Mikromanipulatoren in die Oozyte eingestochen. Die verletzte Oozytenmembran dichtete nach kurzer Zeit um die Elektroden ab und es konnte das Ruhepotenzial gemessen werden (in ORi meist zwischen -20 und -40 mV). Dann wurde die Oozyte auf eine Haltespannung von -40 mV geklemmt. Die zur Beleuchtung dienende Kaltlichtquelle (Typ KL1500, Schott, Mainz) wurde anschließend ausgeschaltet, um eine Erwärmung der Oozyte zu vermeiden. Durch acht dünne Schläuche konnten der Eizelle verschiedene Badlösungen zugeführt werden, die durch modifizierte elektrische Ventile (General Valve, Fairfield, N. J., USA) geschaltet wurden. Die Oozyte sollte ständig mit frischer Lösung umspült werden; eine Absaugung gewährleistete einen konstanten Flüssigkeitsspiegel. Der von der Stromelektrode aufgenommene Strom wurde von dem „voltage clamp“-Verstärker (Typ Turbo TEC-05, npi electronic, Tamm) verstärkt und von einem analogen y-t-Schreiber (Typ BD112, Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) aufgezeichnet. Bei Bedarf konnten nach Tiefpassfilterung der Ströme (Typ 3323, Krohn-Hite, Avon, USA) mit einem Arbeitsplatzrechner (Software ISO2, MFK, Niedernhausen) Strom-Spannungs-Kennlinien aufgenommen werden. Dies wie auch die anschließende Datenauswertung erfolgte analog den in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Verfahren.

## 2.4.2 Durchführung von Experimenten mit der „giant patch clamp“-Technik

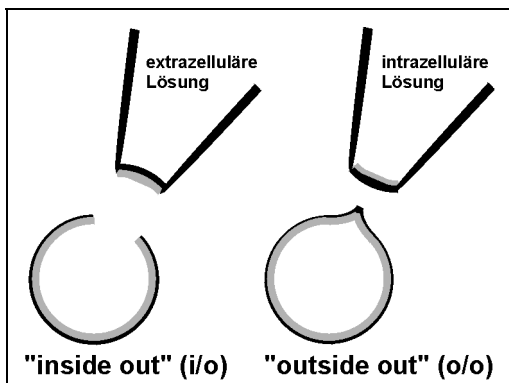
Der Versuchsaufbau für die „giant patch clamp“-Experimente lehnt sich an eine von Friedrich *et al.* beschriebene Versuchsanordnung an (Friedrich *et al.* 1996). Im Wesentlichen besteht der Aufbau aus einem „patch clamp“-Verstärker, einer auf ein inverses Mikroskop montierten geerdeten Messkammer mit einer Zuführung und Absaugung für verschiedene Badlösungen, einem Mikromanipulator zur Halterung der Patchpipette, einem analogen y-t-Schreiber zur Aufzeichnung der gemessenen Ströme und einem Arbeitsplatzrechner zur Steuerung und Aufzeichnung der Spannungspulsexperimente. Im Folgenden wird die Durchführung eines typischen „patch clamp“-Experiments im Detail beschrieben.

Die *Xenopus*-Oozyte wird durch eine stabilisierende Vitellin-Membran geschützt, die vor einem „patch clamp“-Experiment mittels einer spitzen Pinzette entfernt werden musste, um einen ausreichenden Kontakt zwischen der Plasmamembran der Oozyte und der Patchpipette zu ermöglichen (Weinreich *et al.* 1997). In seltenen Fällen, wenn sich bei einer Gruppe von Oozyten die Vitellin-Membran nicht leicht entfernen ließ, wurden die Oozyten für etwa 3 Minuten in eine hyperosmolare Lösung eingelegt, damit die Vitellin-Membran nach Schrumpfung der Oozyte leichter abgelöst werden konnte. Die devitellinierte Oozyte wurde unmittelbar darauf in eine mit Badlösung gefüllte Petrischale (Durchmesser 35 mm) gelegt, die auf den Arbeitstisch eines inversen Mikroskops (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena) montiert war. Das Mikroskop war auf einem schwingungsgedämpften Tisch geschraubt und der gesamte Aufbau zur Abschirmung elektromagnetischer Streufelder aus der Umgebung von einem Faradaykäfig umgeben.

Mikropipetten aus Borosilikatglas wurden mit einem Glas-Mikroelektroden-Ziehgerät (PP-83, Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan) zu einem Spitzendurchmesser von 20-30 µm ausgezogen und leicht hitzepoliert. Die ausgezogenen Pipetten waren extrem empfindlich gegenüber Berührungen an der Spitze, konnten aber für ein bis zwei Tage in einem von der Werkstatt im Hause gefertigten staubdichten Behälter aufbewahrt werden, bevor sie unmittelbar vor einem Experiment mit einer für das jeweilige Experiment geeigneten Pipettenlösung auf der Basis von NMG-Cl oder Sorbitol befüllt wurden. Beim Befüllen aus einer Spritze mit einem 0,2 µm Filter und mit sehr dünn ausgezogener Kunststoffspitze musste sorgfältig darauf geachtet werden, dass die Lösung luftblasenfrei bis in die Spitze der Pipette gelangte und der Schaft der Pipette in der hinteren Hälfte nicht benetzt wurde. In der Spitze verbliebene Luftblasen wurden durch vorsichtiges Klopfen mit

dem Finger beseitigt oder mittels Druckluft aus der Spitze gedrückt. Die Pipette wurde anschließend über den chlorierten Silberdraht des Elektrodenhalters gesteckt. Der Elektrodenhalter wurde nun an die auf einen ölhydraulischen Mikromanipulator (MM-203, Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan) montierte Vorverstärkereinheit geschraubt. In der Pipette wurde mittels Pressluft ein Überdruck von ~2 cm Wassersäule angelegt, um beim Eintauchen in die Badlösung eine Kontamination der Pipettenlösung zu vermeiden.

Die Pipettenspitze wurde in das Bad eingetaucht und vorsichtig an die Eizelle in Äquatorhöhe bis zur Berührung herangefahren. Das Anlegen eines leichten Unterdrucks von 5-40 mm Wassersäule führte in der Regel innerhalb von 3-10 Minuten zu elektrischen Abdichtwiderständen von 1-10 G $\Omega$  (*gigaseal*). Die weitere Vorgehensweise war von der



**Abb. 2.4–1 Patch-Konfigurationen (schematisiert).** Die zytosolatische Membranseite ist grau, die Membranaußenseite schwarz dargestellt.

gewählten Patch-Konfiguration abhängig. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Konfigurationen sind in Abb. 2.4–1 nebeneinander gestellt und werden mit „inside out“- und „outside out“-Konfiguration („i/o“- und „o/o“-Konfiguration) bezeichnet.

Zum Erhalt der „i/o“-Konfiguration wurde nach Etablierung eines Gigaseals durch vorsichtiges Zurückfahren der Pipette das von der Pipettenöffnung umschlossene Membranstück aus der Oozytenmembran herausgerissen. Das so

erzeugte Membranstück (*patch*) nennt man „inside out“-Patch, weil die zytosolatische Membranseite zum Bad hin nach außen gekehrt ist.

Um einen isolierten Membranpatch in „outside out“-Konfiguration zu erhalten, musste zunächst das von der Pipettenöffnung umschlossene Membranstück durchbrochen werden, indem bei leichtem Überdruck (~2 cm) ein kurzer Spannungspuls (~700 mV für 1-5 ms) an die Patchmembran angelegt wurde. Der erfolgte Durchbruch machte sich in einem jähen Abfall des Membranwiderstandes bemerkbar. Beim vorsichtigen Zurückfahren der Pipette bildete sich vom Pipettenrand aus ein mit der extrazellulären Membranseite nach außen gekehrter Schlauch aus, der sich in der Mitte schließt und beim Abreißen einen „outside out“-Patch hinterließ.

Bei dem Erzielen der „i/o“-Konfiguration war das Sich-wieder-Schließen der Plasmamembran unerwünscht und konnte zu Komplikationen führen, indem sich in der Pipettenöffnung ein mit Zytoplasma gefülltes Vesikel bildete. Dieses konnte unter Umständen durch sehr



kurzzeitiges Durchbrechen der Flüssigkeit-Luft-Grenze geöffnet werden, wobei die äußere Seite des Vesikels bei dem Kontakt mit der Luft platzte, während die innere durch Zytoplasmareste geschützt war. Die Überführung des Vesikels in die „i/o“-Konfiguration konnte mit einem sogenannten Vesikeltest überprüft werden, bei dem der Patch einer kalziumhaltigen Badlösung ausgesetzt wurde. Falls die zytoplasmatische Membranseite für die Badlösung frei zugänglich war, wurden endogene kalziumaktivierte Chloridkanäle aktiviert (Miledi 1982) und die Leitfähigkeit der Membran stieg stark an; falls nur die extrazelluläre Membranseite zugänglich war, wurde keine Veränderung der Leitfähigkeit gemessen, weil diese Chloridkanäle nur von der zytoplasmatischen Seite aus aktiviert werden können und die Plasmamembran für Kalziumionen nicht permeabel ist.

Für die Messung wurde die Pipette mit dem „inside out“- oder „outside out“-Patch in eine von der Institutswerkstatt gefertigte Polyethylenkammer mit Zugang für acht enge Schläuche transferiert, durch die verschiedene Badlösungen mittels Pressluft zum Patch geleitet werden konnten, die ebenso wie die Pipettenlösungen auf Sorbitol oder NMG-Cl basierten und Substrate und Hemmstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten konnten (siehe Kapitel 2.2). Modifizierte elektrische Ventile (General Valve, Fairfield, N. J., USA) wurden zum schnellen Wechsel der einzelnen Badlösungen verwendet. Es konnte ein kompletter Lösungswechsel innerhalb 0,5-3 s erreicht werden. Die Petrischale musste mit einer Pumpe (BVC 21, Vakuubrand, Wertheim) leergesaugt werden, damit der Patch immer mit frischer Badlösung umspült wurde.

Eine definierte Spannung oder auch eine Serie von Spannungspulsen konnte mit Hilfe des „patch clamp“-Verstärkers (Typ EPC7, List Medical, Darmstadt und später Typ Axopatch 200B, Axon Instruments, Union City, USA) über die Patchpipette an die Patchmembran angelegt werden. Gleichzeitig wurden über die Patchmembran fließende elektrische Ströme über die Patchpipette aufgenommen und vom „patch clamp“-Verstärker verstärkt. Sämtliche Geräte und elektrisch leitenden Teile waren zentral am „patch clamp“-Verstärker geerdet. Die Erdung des Bades erfolgte über eine an die Vorverstärkereinheit angeschlossene separate Elektrode aus chloriertem Silberdraht, die über eine Salzbrücke (150 mM KCl in zwei Prozent Agar-Agar) mit dem Bad verbunden war.

Alle Experimente wurden bei Zimmertemperatur (20-23 °C) durchgeführt. Gestrichelte Linien in Abbildungen von „patch clamp“-Messungen, die den Zeitverlauf von elektrischen Strömen bei 0 mV Membranpotenzial zeigen, kennzeichnen null durch rOCT2 vermittelten Gesamtstrom und liegen nur wenige Pikoampere über oder unter dem absoluten elektrischen Nullstrom.

### **2.4.3 Datenaufzeichnung und -analyse der „patch clamp“-Experimente**

Der vom „patch clamp“-Verstärker aufgezeichnete Strom wurde mit einem 20 oder 200 Hz Tiefpassfilter (Typ AP255-S, Telemeter Elektronik, Donauwörth) gefiltert und kontinuierlich auf einem analogen y-t-Schreiber (Typ BD112, Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) ausgegeben. Zusätzlich wurde die Stromspur digital mit einer Samplingrate von 50 Hz auf einer Festplatte gespeichert (Software KAN1, MFK, Niedernhausen). Die Stromrichtung ist der üblichen Konvention folgend definiert (Hille 1992): Ein Fluss positiver Ladung von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite der Membran (Auswärtsstrom) resultiert in einem auswärts gerichteten elektrischen Strom und wird als positiv bezeichnet.

Für die Aufnahme von Strom-Spannungs-Kennlinien wurden vor und nach jedem Lösungswechsel mit Hilfe von rechnergesteuerten Spannungsprotokollen (Software ISO3, MFK, Niedernhausen) Spannungspulse von 200 ms Dauer an die Patchmembran angelegt, die alternierend in Schritten von 20 mV meist von -60 mV bis +60 mV und in einigen Fällen von -100 mV bis +80 mV reichten. Die resultierenden Ströme wurden mit 500-1000 Hz gefiltert und unter Benutzung des Computerprogramms ISO3 (MFK, Niedernhausen) digital mit einer Samplingrate von 1-2 kHz gespeichert. Es wurden Spannungsprotokolle während der Perfusion mit Substrat und während der Perfusion ohne Substrat oder mit Inhibitor durchgeführt. Zur Analyse wurden von den in Anwesenheit von Substrat aufgenommenen Strömen korrespondierende Hintergrund-Ströme, das heißt bei Perfusion ohne Substrat oder mit Inhibitor aufgenommene Ströme, abgezogen. Dabei war es wichtig, dass die Hintergrundleitfähigkeit der Patchmembran vor und nach jedem Anlegen von Spannungspulsen unverändert blieb. Die durch Subtraktion erhaltenen Differenzströme wurden über ihren stationären Bereich (zwischen 100 ms und 180 ms des Spannungspulses) gemittelt und als Strom-Spannungskennlinien gegen die Spannung aufgetragen. Die Auswertung der Daten erfolgte auf einem Arbeitsplatzrechner mit den Programmen ANA2 (MFK, Niedernhausen), Origin 5.0 (Microcal, Northampton, MA, USA) und Excel 97 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Bei gemittelten Daten wurde je nach Datensatz die Standardabweichung vom Mittelwert oder von der Einzelmessung errechnet; wenn möglich, erfolgte eine Wichtung der Fehler aus Einzelmessungen. Signifikanzanalysen wurden mit einem Anova-Test durchgeführt.

Zur Beschreibung und Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit eignen sich in der Regel lineare, exponentielle oder hyperbolische Funktionen. Insbesondere wurde die aus der Hill-

Gleichung hervorgehende Michaelis-Menten-Gleichung (Hillkoeffizient = 1)

$$I = I_{\max} \cdot [S] \cdot (K_m + [S])^{-1} \quad (5)$$

an viele Messdaten angepasst, wobei  $I$  den Transmembranstrom,  $[S]$  die Substratkonzentration,  $I_{\max}$  den (maximalen) Transmembranstrom bei sättigender Substratkonzentration und  $K_m$  die apparente Michaelis-Menten-Konstante oder Bindungskonstante bezeichnet.  $K_m$  wird auch als Halbsättigungskonstante ( $K_{0,5}$ ) bezeichnet, weil eine Substratkonzentration in dieser Höhe einen halbmaximalen Transmembranstrom verursacht.

Der maximale Strom in Anwesenheit eines nichtkompetitiven Inhibitors ( $I_{n.k.\max}$ ) ist geringer als ohne und  $I_{\max}$  aus Gleichung (5) geht in

$$I_{n.k.\max} = I_{\max} - I_{\max} \cdot [I] \cdot (K_I + [I])^{-1} \quad (6)$$

mit  $[I]$  = Inhibitorkonzentration und  $K_I$  = apparente Inhibierungskonstante über. Dabei bleibt  $K_m$  unverändert.

Im Falle einer kompetitiven Hemmung wird  $K_m$  aus Gleichung (5) zu

$$K_k = K_m + K_m \cdot [I] \cdot (K_I)^{-1}. \quad (7)$$

Die apparente Michaelis-Menten-Konstante in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors ( $K_k$ ) ist erhöht, aber bei sättigenden Substratkonzentrationen kann der gleiche Maximalstrom wie ohne Inhibitor erreicht werden.

Die Ergebnisse der Kompetitionsversuche wurden zweckmäßigerweise in einem Lineweaver-Burk-Diagramm linearisiert dargestellt. In diesem wird der Transmembranstrom gegen die Substratkonzentration doppeltreziprok aufgetragen. Dabei geht Gleichung (5) über in

$$I^{-1} = (I_{\max})^{-1} + K_m \cdot (I_{\max})^{-1} \cdot ([S])^{-1}. \quad (8)$$

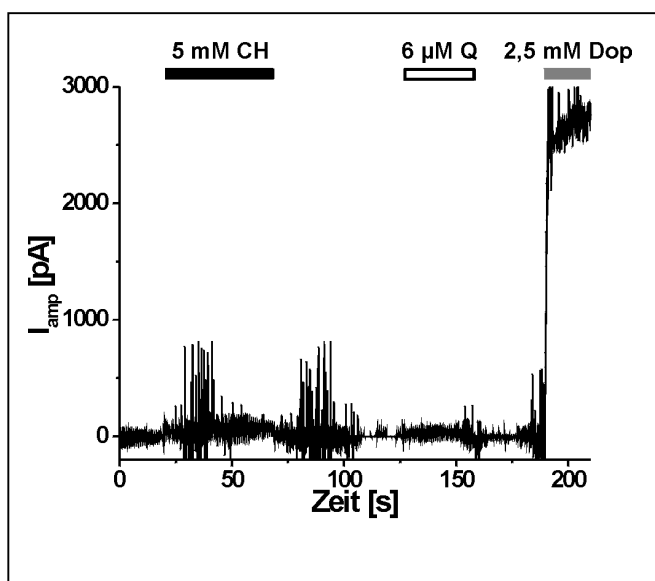
#### **2.4.4 Durchführung von Experimenten mit der amperometrischen Spannungsklemme**

Für die Experimente mit der amperometrischen Spannungsklemme wurde ein modifizierter Versuchsaufbau der in Kapitel 1.5.1 beschriebenen konventionellen Zwei-Elektroden-Spannungsklemme verwendet. Der Aufbau wurde um eine Carbonfaser-Elektrode (Typ CFN30-1000, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) und einen Amperometrie-Verstärker (Typ Mikro C, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) mit Referenzelektrode erweitert. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit einem analogen und zusätzlich einem digitalen y-t-Schreiber (Software KAN1, MFK, Niedernhausen) auf jeweils 2 Kanälen.

Vor jeder Messung musste zunächst eine Carbonfaser-Elektrode vorbereitet werden. Sie besteht aus einer Carbonfaser von 30 µm Durchmesser, die in eine Glaskapillare eingebettet ist und an der Spitze 1000 µm weit herausragt. Durch eine Beschichtung mit Nafion, einem perfluorosulfontem Polymer, können anionische Substanzen nicht mehr an die Carbonoberfläche gelangen, so dass die Elektrode für kationische Metabolite bis zu zweihundert Mal empfindlicher als für Ascorbinsäure ist. Die Carbonfaser-Elektrode wurde zunächst bei +1,2 V für 5 bis 10 Minuten in stark basischem Milieu (150 mM Natriumchlorid, pH 9,5) aktiviert. Anschließend wurde sie auf einen Mikromanipulator (Typ M1, H. Saur, Reutlingen) montiert und mit der Spitze in die mit ORi perfundierte Kammer getaucht. Die Referenz-Elektrode des Amperometrie-Verstärkers wurde an die Erdungsleitung des „voltage clamp“-Verstärkers angeschlossen. Die Carbonfaser-Elektrode wurde nun auf ein Potenzial von +550 bis +800 mV gelegt und geeicht, indem die Kammer mit ORi-Lösungen steigender Dopaminkonzentration (100 nM bis 10 mM) gespült wurde. Je empfindlicher die Faser und je höher die angelegte Spannung war, desto größer war der vom Verstärker aufgezeichnete Redox-Strom (~20 pA bis 2 µA), jedoch nahm mit höherer Spannung gleichzeitig die Selektivität für Dopamin ab. Eine aktivierte Elektrode konnte mehrere Stunden für Experimente verwendet werden, wobei ihre Empfindlichkeit währenddessen kontinuierlich abnahm, und konnte bis zu fünfmal gereinigt und wiederaktiviert werden. Eine (in Dopamin vorinkubierte) Oozyte wurde in die Kammer gelegt und die Spitze der Carbonfaser-Elektrode wurde tangential mit der Eizelle in Kontakt gebracht. Die Oozyte wurde nun wie in 2.4.1 beschrieben auf ein Potenzial von -40 mV geklemmt.

#### *Hintergrundstrom an der Carbonfaser-Elektrode*

Vor der Durchführung von Experimenten mit der amperometrischen Spannungsklemme war in Vorversuchen die Untersuchung des Einflusses von ORi, Dopamin und verschiedenen Substraten auf die Carbonfaser-Elektrode notwendig. Nach dem Eintauchen der Carbonfaser-Elektrode ins Bad (ORi) wurde der Redox-Strom zunächst auf null geregelt. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Carbonfaser-Elektrode wurde das Bad mit ORi + 2,5 µM Dopamin perfundiert. Diese Dopaminkonzentration führte in Abhängigkeit der Empfindlichkeit der Carbonfaser-Elektrode und ihrem Potenzial zu Redox-Strömen zwischen 500 pA und 3000 pA (siehe Abb. 2.4–2); das sind Ströme derselben Größenordnung wie typischerweise bei dem Auswärtstransport von Dopamin an vorinkubierten, rOCT2 exprimierenden Oozyten gemessen wurden. Die Perfusion mit verschiedenen Substraten führte zu Hintergrundströmen, die von dem zugeführten Substrat sowie von der Elektrodenempfindlichkeit abhängig und



**Abb. 2.4–2 Hintergrundstrom an der Carbonfaser-Elektrode in Abwesenheit einer Oozyte.** Nach dem Eintauchen der Carbonfaser-Elektrode ins Bad (ORi) wurde der vorhandene Redox-Strom der Carbonfaser-Elektrode auf null geregelt. Die Perfusion der Badlösung mit 5 mM Cholin (CH) und mit 6 µM Chinin (Q) führt zu zusätzlichen Redox-Strömen. Beim Lösungswechsel zu Cholin ist ein schnell von 0 pA auf 100 pA ansteigender und auf 40 pA wieder abfallender transientser Strom sichtbar. Beim Lösungswechsel zurück zu ORi trat ein etwa gleich großer transientser Strom mit umgekehrtem Vorzeichen auf (von +70 pA über -30 pA auf +20 pA). Die Perfusion mit 2,5 µM Dopamin (Dop) führte zu einem Redox-Strom von 2800 pA.

wahrscheinlich auf Verunreinigungen durch oxidierbare Substanzen zurückzuführen waren. Die Perfusion mit 5 mM Cholin verursachte je nach Experiment einen stationären Strom von 10 bis 100 pA, die Perfusion mit 6 µM Quinin von etwa 20 pA. Vor allem die Hintergrundströme der Cholinlösung mussten bei Transstimulationsexperimenten berücksichtigt werden.

Beim Lösungswechsel von einer Lösung mit Substrat zu einer ohne Substrat beziehungsweise umgekehrt traten oft transiente Ströme von bis zu 200 pA auf. Sie wurden vermutlich dadurch verursacht, dass sich nach einem Lösungswechsel erst ein neues stationäres Gleichgewicht zwischen reduziertem und oxidiertem Substrat (zum Beispiel Dopamin und das Orthochinon mit  $H^+$ ) an der Oberfläche der Carbonfaser-Elektrode einstellen musste (Fisher 1996). Das Potenzial der Carbonfaser-Elektrode als Elektrode der dritten Art ist nämlich vom Konzentrationsverhältnis der oxidierten zur reduzierten Komponente des Redox-Paares abhängig (Henze und Neeb 1986). Der Redox-Strom ist durch die Verfügbarkeit von oxidierbaren Molekülen limitiert, die in Abhängigkeit von Konvektion und Diffusion nachgeliefert werden müssen. Die Konvektion ist durch die Geschwindigkeit des Lösungswechsels begrenzt, der im Bereich von einigen Sekunden lag. Mit derselben Geschwindigkeit wie die Konzentration an oxidierbarem Substrat an der Elektrode ansteigt, kann auch der Redox-Strom ansteigen. Um die Elektrode bildet sich andererseits durch den Verbrauch von oxidierbarem Substrat eine zunächst anwachsende ungerührte Schicht aus, durch die die Diffusion der redoxaktiven Substanzen nach dem zweiten Fickschen Gesetz erfolgt (Henze und Neeb 1986; Fisher 1996). Vermutlich dadurch kam es zu einer Abnahme des Redox-Stroms, bis sich ein neuer stationärer Zustand ausgebildet hatte.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Messungen an ganzen Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ganzen Oozyten wurde oft für Vorversuche vor den viel aufwendigeren „patch clamp“-Versuchen benutzt. Meistens handelte es sich dabei entweder um Kontrolle und Optimierung der Expression von rOCT2 oder um erste Tests mit bisher im Zusammenhang mit rOCT2 noch nicht näher untersuchten Substanzen wie zum Beispiel Schwermetallen. Es wurden außerdem Versuche im Zusammenhang mit dem Phosphorylierungsgrad von rOCT2 gemacht. Darüber hinaus wurden einige Experimente zur Charakterisierung der Hemmung durch extrazellulär zugeführtes Chinin bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

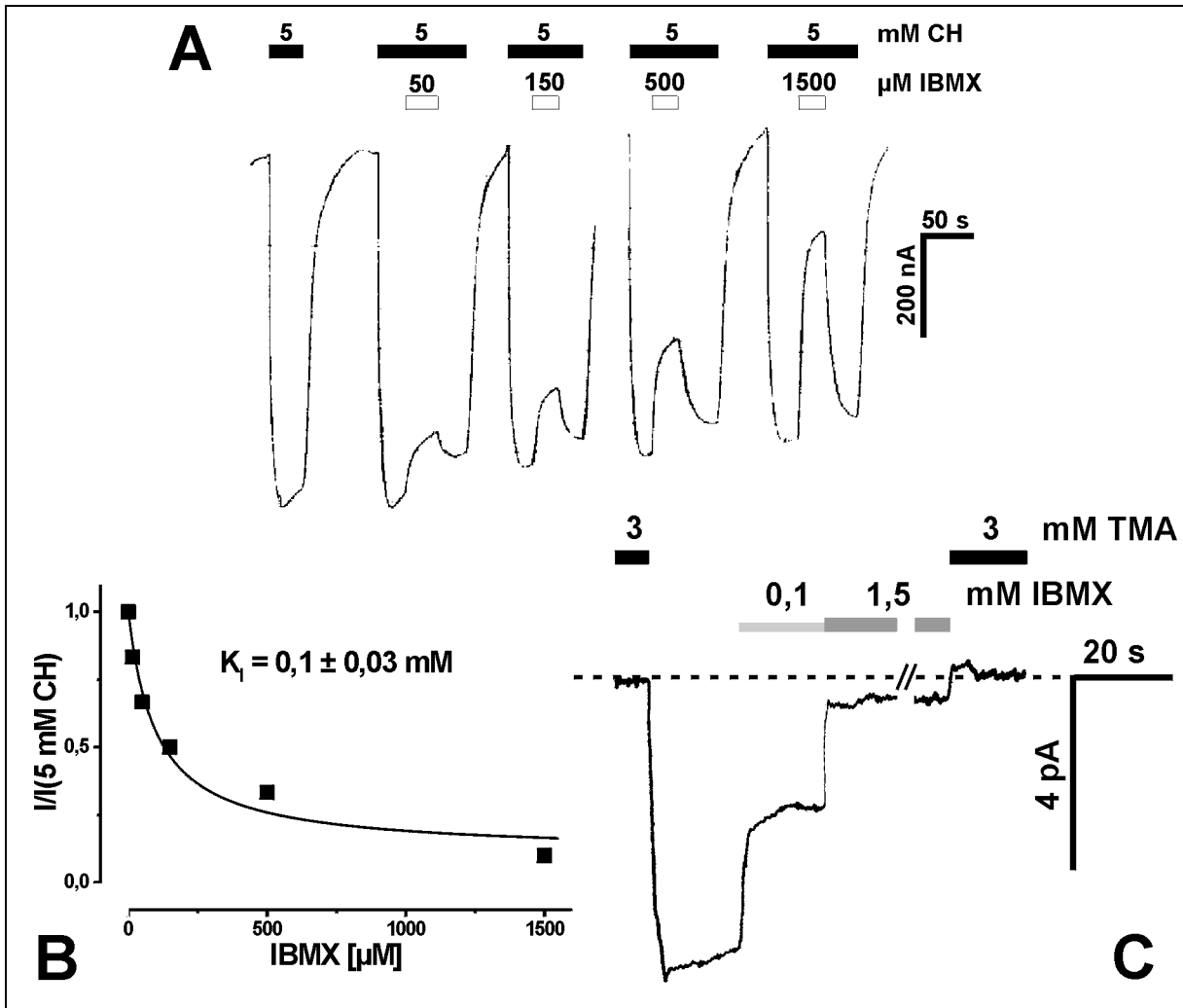
#### 3.1.1 Stimulation der Proteinkinasen A und C

Die in „patch clamp“-Experimenten während einer Messung auftretende stetige Abnahme des rOCT2-vermittelten Stromes (*rundown*), sowie die allgemein relativ niedrigen Ströme im Patch machten eine Suche nach Möglichkeiten zur Signalerhöhung wünschenswert. Für rOCT1 wurde in HEK293-Zellen eine Stimulation des rOCT1-vermittelten Transportes sowohl durch Proteinkinase A als auch Proteinkinase C gefunden (Mehrens *et al.* 2000). Im Falle von rOCT2, ebenfalls ein Protein mit mehreren möglichen Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen A und C, wäre als Ursache für den *rundown* deshalb eine allmähliche Dephosphorylierung durch endogene, membrangebundene Phosphatasen denkbar, wie sie zum Beispiel für CFTR gefunden wurde (Weinreich *et al.* 1999). Zur Untersuchung, ob der Phosphorylierungsgrad von rOCT2 für die Signalthöhe eine Rolle spielt, wurden in „voltage clamp“-Experimenten an ganzen Oozyten zum einen Forskolin und IBMX zur Erhöhung des zytoplasmatischen [cAMP]-Spiegels und damit zur Stimulation der Proteinkinase A, sowie zum anderen Phorbolester (PMA) zur Stimulation der Proteinkinase C appliziert. Während 10  $\mu$ M Forskolin fast keinen Effekt auf den durch Cholin induzierten Einwärtsstrom hatte, bewirkte die Zugabe von 1,5 mM IBMX eine starke Stromabnahme. Die Stromabnahme erfolgte so prompt, dass an Stelle einer indirekten Regulation über die Inhibierung der Phosphodiesterase und einer damit einhergehenden Erhöhung des [cAMP]-Spiegels eher eine direkte Interaktion von IBMX mit dem Protein vermutet wurde. Deshalb

wurde eine Titration der Hemmung des Cholin-Einstroms durch extrazellulär zugeführtes IBMX durchgeführt. Eine typische Messung mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist in Abb. 3.1–1 gezeigt. Es ist zu beachten, dass aufgrund der fehlenden Kontrolle über das Zytoplasma keine wohl definierte Grundlinie zu erkennen ist. Die Perfusion mit 1500  $\mu\text{M}$  IBMX hemmt scheinbar nur zwei Drittel des cholininduzierten Stromes. Tatsächlich ist die Inhibierung viel stärker, da der Strom nach Wegnahme des Cholins aus dem Bad einen teilweisen Ausstrom des zuvor in die Oozyte gelangten Cholins beinhaltet und der Nullstrom bezüglich dem durch rOCT2 vermittelten Transport von organischen Kationen tiefer liegt. Man kann dies anhand von Strom-Spannungskennlinien nachweisen, wie in Abb. 3.1–3 für die Inhibierung durch Cadmium gezeigt ist. Die Inhibierungsmessungen mit IBMX führten zu einer stark von Zelle zu Zelle variierenden apparenten Inhibierungskonstante von  $\sim 50 \mu\text{M}$  bis zu  $\sim 500 \mu\text{M}$  für IBMX von der extrazellulären Seite (siehe exemplarisch Abb. 3.1–1). Durch Messungen an isolierten „inside out“-Patchen konnte auch eine Hemmung des Ein- und Ausstromes durch zytoplasmatisch zugeführtes IBMX gefunden werden. Die zytoplasmatische Zuführung von 0,1 mM IBMX führte zu einer Reduktion des durch 3 mM TMA in der Pipette verursachten Einstromes um ungefähr die Hälfte, die Perfusion mit 1,5 mM inhibierte den Einstrom fast komplett (siehe Abb. 3.1–1C). Auf „patch clamp“-Messungen dieser Art (bei Vorbeladung der Patchpipette mit Substrat) wird in Kapitel 3.2.3 genauer eingegangen werden.

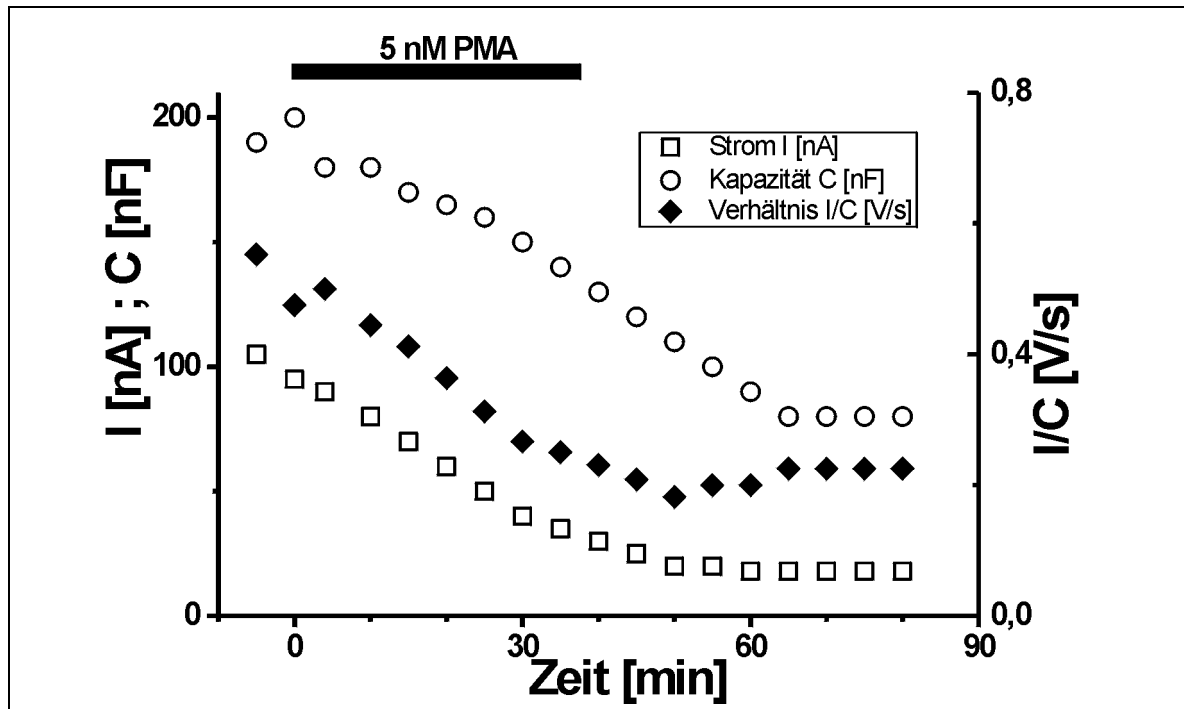
Die Zugabe von 50 nM  $\beta$ -Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu einer mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme auf  $-40 \text{ mV}$  geklemmten, rOCT2 exprimierenden Oozyte führte zu einer allmählichen Abnahme des durch Cholin induzierten Einwärtsstromes. Neben der permanenten Aktivierung der Proteinkinase C hat die Zugabe von Phorbol-ester in Oozyten einen weiteren Effekt, nämlich die Verkleinerung der Plasmamembranoberfläche durch Endozytose (Vasilets *et al.* 1990). Die beobachtete Stromabnahme könnte also ganz oder teilweise durch eine mit dieser Membranflächenabnahme einhergehenden Verringerung der Anzahl der Transportermoleküle erklärt werden. Die Flächenabnahme kann über die Messung der Membrankapazität bestimmt werden, da Membrankapazität und -fläche zueinander proportional sind. Unter der Annahme, dass auch die Transporteranzahl proportional mit der Membranfläche abnimmt, kann die durch die Endozytose bedingte Stromabnahme durch Quotientenbildung vom beobachteten Einwärtsstrom zur Membrankapazität herausgerechnet werden. Ein konstanter Quotient spiegelt eine konstante Stromdichte und damit einen unveränderten Strom pro Transportermolekül wieder. In Abb. 3.1–2 ist für eine „voltage clamp“-Messung der Quotient aus Transmembranstrom zu Membrankapazität gegen

die Zeit aufgetragen worden. Der Quotient wurde nach der Zugabe von 50 nM PMA mit der Zeit kleiner. PMA hatte folglich einen hemmenden Effekt auf den durch Cholin induzierten Einstrom.



**Abb. 3.1–1 Inhibition von substratinduzierten Strömen durch IBMX.** **A:** Stromspur einer mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme bei  $-50 \text{ mV}$  geklemmten, rOCT2 exprimierenden Oozyte. Die Oozyte wurde mit ORi(NaCl) perfundiert. Schwarze Balken kennzeichnen die Perfusion mit  $5 \text{ mM}$  Cholinchlorid, weiße die zusätzliche Zugabe von  $50$ ;  $150$ ;  $500$  und  $1500 \mu\text{M}$  IBMX. **B:** Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition durch IBMX. Eine mit  $20 \text{ ng}$  rOCT2-mRNA injizierte Oozyte wurde bei  $-40 \text{ mV}$  geklemmt und analog zu (A) mit ORi(NaCl),  $5 \text{ mM}$  Cholinchlorid sowie  $15$ ;  $50$ ;  $150$ ;  $500$  und  $1500 \mu\text{M}$  IBMX perfundiert. Nach Normierung auf die durch  $5 \text{ mM}$  Cholin induzierten Einstrome wurde zur Berechnung der apparenten Inhibierungskonstante  $K_i$  eine modifizierte Michaelis-Menten-Funktion (mit  $y = 1 - I$ ) an die Daten angepasst. **C:** Trans-Inhibition durch IBMX im „i/o“-Patch. Die Pipette wurde mit  $3 \text{ mM}$  TMA vorbeladen, das Bad wurde mit  $3 \text{ mM}$  TMA,  $0,1$  oder  $1,5 \text{ mM}$  IBMX oder ohne Substrat perfundiert (durch Balken oder das Fehlen von Balken gekennzeichnet). Unter symmetrischen Bedingungen, das heißt mit  $3 \text{ mM}$  TMA in Pipette und Bad (schwarze Balken) wurde ein Nettostrom von null beobachtet (gestrichelte Linie). Die völlige Wegnahme von Substrat aus dem Bad führte zu einwärts gerichteten Strömen. Die Zuführung von  $0,1 \text{ mM}$  IBMX hemmt den Einwärtsstrom um  $\sim 50 \%$ , die Zuführung von  $1,5 \text{ mM}$  fast vollständig.





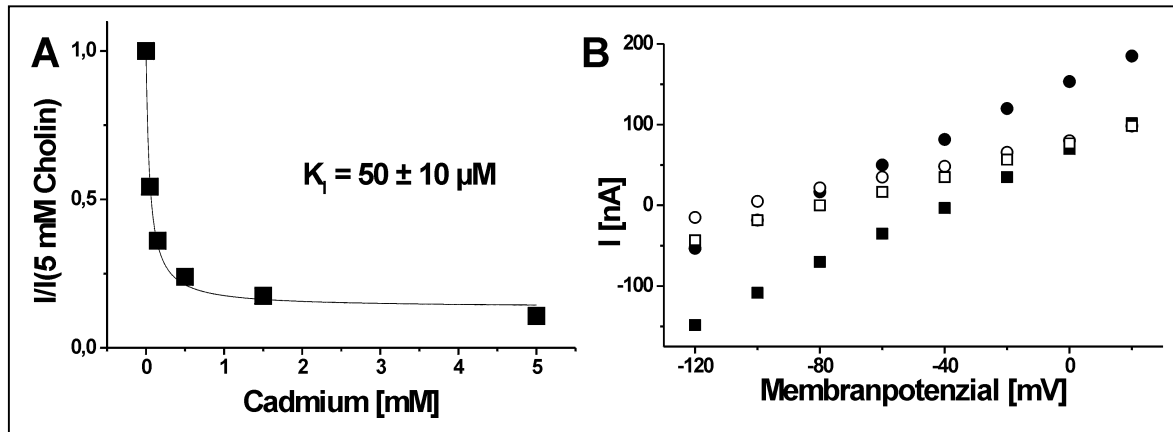
**Abb. 3.1–2 Zeitliche Änderung des Quotienten aus cholininduziertem Transmembranstrom und Membrankapazität bei Zugabe von Phorbol ester.** Im Verlauf einer „voltage clamp“-Messung wurden der durch Zugabe von 5 mM Cholin induzierte Strom (Quadrate) und die Membrankapazität (Kreise) aufgenommen. Der Quotient aus diesen beiden Größen (Rauten) ist proportional zur Stromdichte und bei konstanter Proteindichte in der Plasmamembran ein Maß für die Aktivität von rOCT2. Seine Abnahme bei Zuführung von 50 nM Phorbol ester (PMA) deutet auf eine Regulation von rOCT2 durch Proteinkinase C hin.

### 3.1.2 Einfluss von extrazellulär zugeführten Hemmstoffen auf den elektrischen Strom

#### 3.1.2.1 Extrazellulär zugeführte Schwermetalle

Die anorganischen Kationen der Schwermetalle Kobalt, Nickel, Zink und Kadmium zeigten eine Wechselwirkung mit rOCT2. Der durch extrazelluläre Zugabe von 5 mM Cholinchlorid verursachte elektrische Einstrom in rOCT2 exprimierenden Oozyten konnte durch extrazelluläre Zugabe von Schwermetallionen in unterschiedlicher Stärke vermindert werden. 5 mM  $\text{CoCl}_2$  hemmten ihn reversibel um 37 %, 5 mM  $\text{NiCl}_2$  um 50 % und 5 mM  $\text{ZnCl}_2$  sowie 5 mM  $\text{CdCl}_2$  jeweils um 95 %, während 5 mM  $\text{BaCl}_2$  keinen Einfluss auf den durch rOCT2 verursachten Strom hatte. Eine Auswertung von Strom-Spannungskennlinien wie in Abb. 3.1–3 für Cadmium zeigt, dass die Schwermetalle selbst von rOCT2 nicht transportiert werden. Dies wird aus der vergleichsweise flachen Steigung der in Anwesenheit von Cadmiumchlorid genommenen Kennlinien deutlich (siehe auch Nagel *et al.* 1997). Für Cadmium wurde die Hemmung des durch Cholin induzierten Einstromes durch Zugabe von  $\text{CdCl}_2$  in verschiedenen Konzentrationen näher untersucht. Es ergab sich eine mit einer

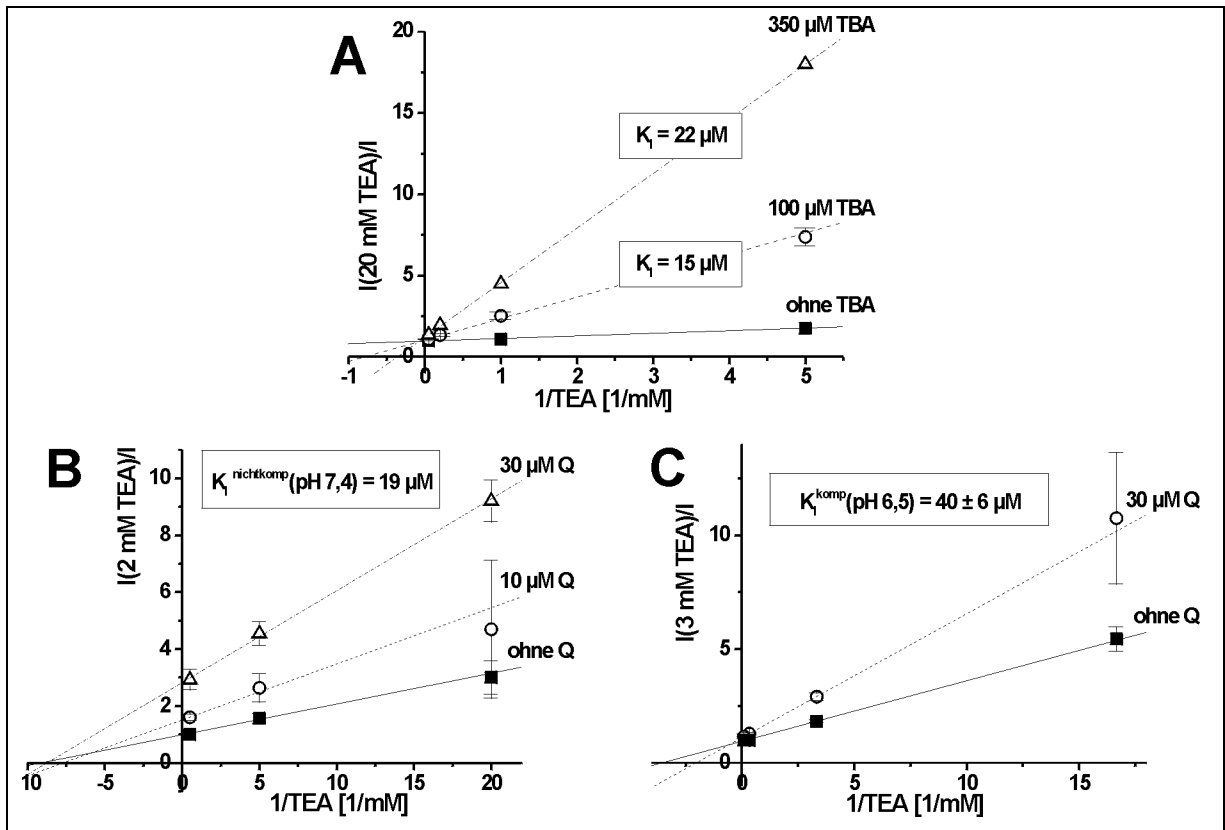
Michaelis-Menten-Funktion anpassbare Hemmkinetik mit einer apparenten Inhibierungskonstante von  $\sim 50 \mu\text{M}$  Cadmium (siehe Abb. 3.1–3A).



**Abb. 3.1–3 Inhibition von durch Cholin induzierten Strömen durch Cadmium.** **A:** Eine rOCT2 exprimierende Oozyte wurde bei  $-40 \text{ mV}$  geklemmt und mit  $\text{ORi}(\text{NaCl})$  perfundiert. Jeweils nach alleiniger Zugabe von  $5 \text{ mM}$  Cholin erfolgte die zusätzliche Zugabe von Cadmium in Konzentrationen von  $0,05$ ;  $0,15$ ;  $0,5$ ;  $1,5$  und  $5 \text{ mM}$ . Zur Bestimmung der apparenten Inhibierungskonstante wurde eine modifizierte Michaelis-Menten-Funktion an die Daten angepasst. **B:** Strom-Spannungskennlinien einer mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in  $\text{ORi}(\text{NaCl})$  gemessenen, rOCT2 exprimierenden Oozyte. Die Kennlinien wurden in Abwesenheit von  $\text{CdCl}_2$  (geschlossene Symbole), in Abwesenheit von Cholin (Kreise), in Anwesenheit von  $5 \text{ mM}$   $\text{CdCl}_2$  (offene Symbole) und in Anwesenheit von  $5 \text{ mM}$  Cholin (Quadrate) genommen.

### 3.1.2.2 Einfluss der Inhibitoren TBA und Chinin auf den elektrischen Strom

Mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurde der Mechanismus der Hemmung rOCT2-vermittelter Ströme von der extrazellulären Seite an ganzen Zellen untersucht, zunächst durch permanent geladene TBA-Ionen und dann bei verschiedenen pH-Werten durch Chinin, da dessen Ladungszustand bei einem  $\text{pK}$ -Wert von  $8,4$  vom pH-Wert abhängig ist (Notterman *et al.* 1986). Wie in Abb. 3.1–4A gezeigt, schneiden sich die Regressionsgeraden in An- und Abwesenheit von TBA auf der y-Achse. Die Hemmung von durch TEA induzierten Einwärtsströmen durch TBA bei pH  $7,4$  ist deshalb kompetitiv mit einer apparenten Inhibierungskonstante von  $15 \mu\text{M}$  (für  $100 \mu\text{M}$  TBA) beziehungsweise  $22 \mu\text{M}$  (für  $350 \mu\text{M}$  TBA). Dagegen ist die Hemmung durch  $10 \mu\text{M}$  oder  $30 \mu\text{M}$  Chinin bei pH  $7,4$  in Abb. 3.1–4B deutlich nichtkompetitiv ( $K_i = 19 \mu\text{M}$ ). Bei pH  $6,5$  (Abb. 3.1–4C) liegt für Chinin ein gemischter oder eher kompetitiver Hemmtypus vor ( $K_i^{\text{komp}} = 40 \pm 6 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ). Messungen bei pH  $8,5$  wurden ebenfalls durchgeführt, waren aber wegen einer schlechten Verträglichkeit des basischen Milieus für die Oozyten zur Bestimmung des Hemmtypus nicht verwendbar.



**Abb. 3.1–4 Lineweaver-Burk-Diagramme für die Hemmung des Einstromes von TEA durch TBA und Chinin. A:** Hemmung des durch 0,2; 1; 5 und 20 mM TEA vermittelten Einstromes durch 350  $\mu\text{M}$  TBA ( $n = 1$ , Dreiecke) und 100  $\mu\text{M}$  TBA ( $n = 3$ , Kreise) sowie ungehemmter Strom ( $n = 1$ , Quadrate) bei pH 7,4. Der Schnittpunkt der durch die Daten gelegten Regressionsgeraden liegt auf der y-Achse, was auf einen kompetitiven Hemm-Mechanismus hindeutet. **B:** Hemmung des durch 0,05; 0,2 und 1 mM TEA vermittelten Einstromes durch 30  $\mu\text{M}$  Chinin ( $n=2$ , Dreiecke) und 10  $\mu\text{M}$  Chinin ( $n = 2$ , Kreise) sowie ungehemmter Strom ( $n = 4$ , Quadrate) bei pH 7,4. Der Schnittpunkt der durch die Daten gelegten Regressionsgeraden liegt auf der x-Achse, was auf einen nichtkompetitiven Hemm-Mechanismus hindeutet. **C:** Hemmung des durch 0,06; 0,3; 3 und 10 mM TEA vermittelten Einstromes durch 30  $\mu\text{M}$  Chinin ( $n = 3$ , Kreise) sowie ungehemmter Strom ( $n = 3$ , Quadrate) bei pH 6,5. Der Schnittpunkt der durch die Daten gelegten Regressionsgeraden liegt weder auf der y- noch auf der x-Achse, was auf einen gemischten kompetitiven Hemm-Mechanismus hindeutet.

## **3.2 Charakterisierung von rOCT2 in „giant membrane patches“**

### **3.2.1 Einfluss von zytoplasmatisch zugeführten organischen Kationen auf den elektrischen Strom**

Nach heterologer Expression von rOCT2 in *Xenopus*-Oozyten wurde der elektrogene Auswärts-Transport organischer Kationen durch rOCT2 an isolierten *giant membrane patches* aus der Oozyten-Plasmamembran in „inside out“-Konfiguration untersucht<sup>2</sup> (siehe Abb. 2.4–1).

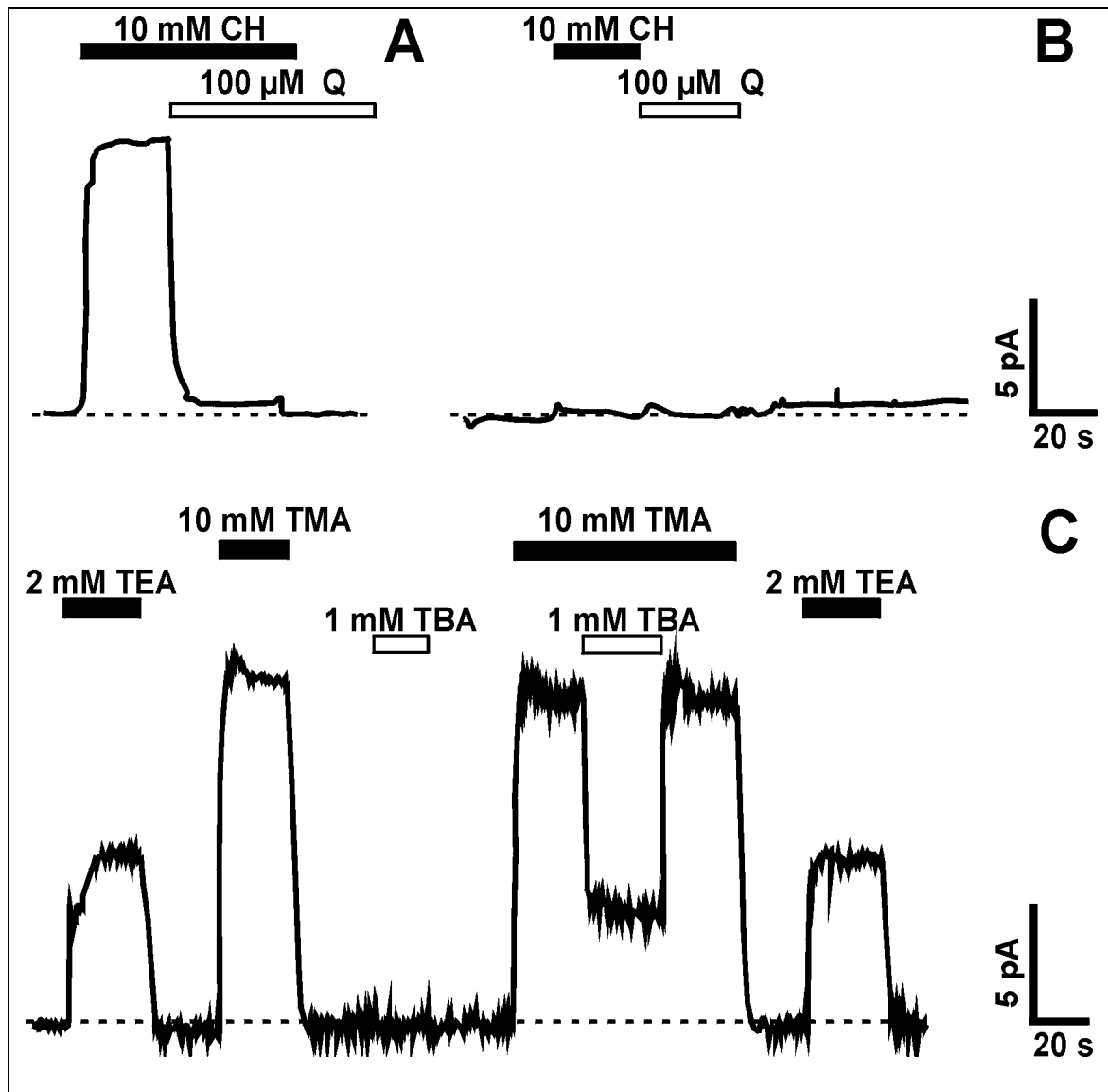
#### **3.2.1.1 Stimulation und Inhibierung von Auswärtsströmen**

Der Transport von organischen Kationen durch rOCT2 ist polyspezifisch. Strukturell sehr unterschiedliche organische Verbindungen können spezifisch an rOCT2 binden. Während einige davon durch ihre Bindung lediglich einen Transport anderer Substrate hemmen können, werden andere tatsächlich von rOCT2 über die Zellmembran transportiert. Die Mehrzahl der transportierten Verbindungen sind relativ kleine, permanent geladene organische Kationen wie TMA, TEA oder Cholin. Aber auch größere organische Kationen wie Dopamin oder NMG mit einer Molmasse von ~200 g/mol können offensichtlich von rOCT2 transportiert werden. Die nicht transportierten, an rOCT2 bindenden Substanzen sind ungezählt und weitaus vielgestaltiger; sie besitzen oft, aber nicht notwendigerweise bei physiologischem pH-Wert eine positive Ladung. Für folgende Stoffe konnte in eigenen Experimenten eine hochaffine Hemmung nachgewiesen beziehungsweise bestätigt werden: Chinin, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), D-Tubocurarin, Corticosteron, TPA und TBA. Zur Untersuchung der Bindungs- und Transporteigenschaften der zytoplasmatischen Seite von rOCT2 wurden die in Experimenten an ganzen Zellen oft verwendeten Modell-Substanzen Cholin, Chinin und Dopamin gewählt, sowie die n-Tetra-Alkylammoniumionen TMA, TEA, TPA und TBA und das ungeladene IBMX (siehe Abb. 2.1–1).

Abb. 3.2–1 zeigt, welchen Effekt die Zugabe von Cholin, TEA, TMA, TBA und Chinin von der zytoplasmatischen Seite her auf den elektrischen Strom durch die Patchmembran hatte. Bei Experimenten mit nicht injizierten Kontroll-Oozyten hatte die Zugabe von organischen

---

<sup>2</sup> Soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt, sind alle Messungen in „inside out“-Konfiguration durchgeführt worden.



**Abb. 3.2–1 Substratvermittelte elektrische Auswärtsströme durch die Patchmembran bei 0 mV Membranpotenzial.** Die Balken über den Stromspuren kennzeichnen die badseitige (zytoplasmatische) Zugabe von 10 mM Cholin (CH), 100 μM Chinin (Q), 10 mM TMA, 2 mM TEA und 1 mM TBA. **A** und **C**: rOCT2 exprimierende Oozyten. **B**: Uninjizierte Oozyte.

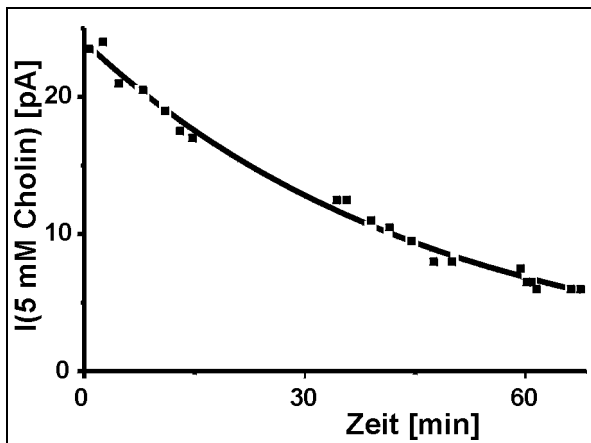
Kationen keinen von den üblichen Stromschwankungen unterscheidbaren Effekt ( $\sim 0.5$  pA,  $n = 15$ , siehe Abb. 3.2–1B).

Patche von rOCT2 exprimierenden Oozyten zeigten jedoch einen ausgeprägten Auswärtsstrom bei Zugabe von Cholin, TMA oder TEA, der durch die Applikation von Chinin oder TBA inhibiert werden konnte. Dabei verursachten Chinin und TBA allein keine Stromänderung. Die Zugabe von 5 bis 20 mM Cholin induzierte bei 0 mV Auswärtsströme bis zu 30 pA. Während die durch 5 bis 20 mM TMA induzierten Ströme in derselben Größenordnung lagen, waren die mit TEA maximal erreichbaren Ströme (bei Zugabe von 2 mM TEA) nur halb so hoch. Die Stromamplitude hing nicht nur vom Substrat und seiner

Konzentration ab, sondern auch allgemein von der Stärke der Expression von rOCT2, der Größe des isolierten Membranpatches und von der Stelle, an der der Patch herausgerissen wurde.

### 3.2.1.2 Signalabnahme während einer „patch clamp“-Messung

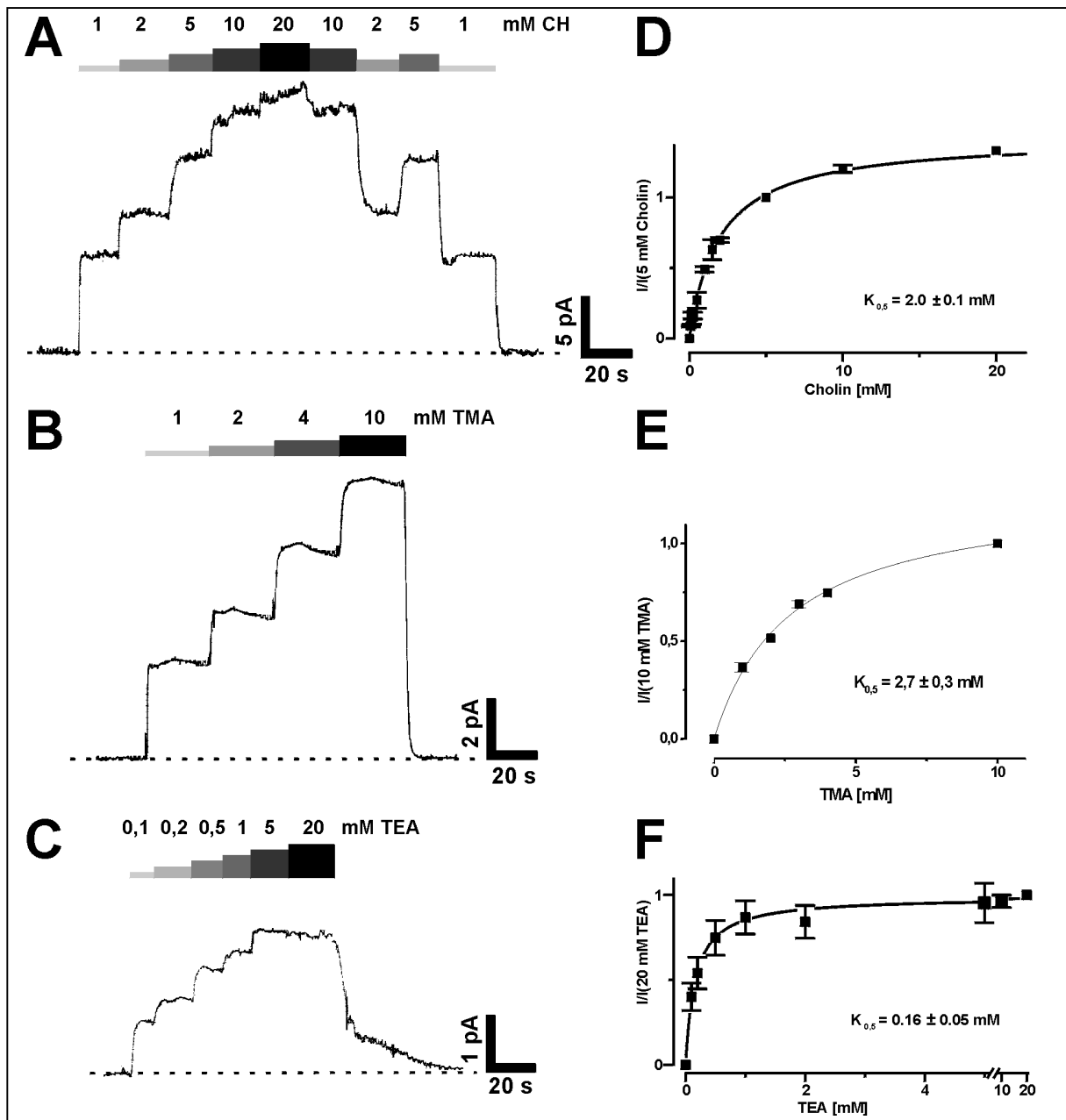
Abb. 3.2–2 zeigt, dass der durch Cholin induzierte Auswärtsstrom während eines „patch clamp“-Experiments stetig kleiner wurde, ein Phänomen, das oft bei „patch clamp“-Messungen auftritt und häufig als *rundown* bezeichnet wird. Bei der Bestimmung von kinetischen Parametern wie zum Beispiel apparenten Halbsättigungskonstanten musste die Signalabnahme berücksichtigt werden. Die Zeitkonstante der Signalabnahme war variabel und lag im Bereich von 10 bis 50 Minuten.



**Abb. 3.2–2 Signalabnahme während einer „patch clamp“-Messung.** 5 mM Cholin wurde dem Bad zu verschiedenen Zeiten zugegeben (Quadrate). Die Abnahme des elektrischen Stromes konnte mit einer monoexponentiellen Funktion beschreiben werden. In diesem Fall war die Zeitkonstante 50 min.

### 3.2.1.3 Substratabhängigkeit der Auswärtsströme

Frühere Messungen ohne direkten Zugang zur zytoplasmatischen Membranseite gaben Hinweise darauf, dass rOCT1 und rOCT2 auch einen elektrogenen Auswärtsstrom vermitteln kann (Nagel *et al.* 1997). Strommessungen an isolierten „inside out“-Patches, wie in Abb. 3.2–1 gezeigt, bestätigen diese Vermutung und erlauben die präzise Bestimmung apparenter Bindungskonstanten ( $K_{0,5}$ ) für organische Kationen auf der zytoplasmatischen Seite. Dazu wurden wie in Abb. 3.2–3 bei einem Membranpotenzial von 0 mV unterschiedliche Konzentrationen organischer Kationen appliziert und der induzierte Auswärtsstrom gemessen. Abb. 3.2–3D fasst Messungen an sechs unterschiedlichen Membranpatches mit verschiedenen Cholinkonzentrationen zusammen. Die durch Cholin induzierten Auswärtsströme lassen sich gut mit einer Michaelis-Menten-Gleichung anpassen und führen bei 0 mV Membranpotenzial zu einer apparenten Bindungskonstante von  $2,0 \pm 0,1$  mM. Der bei sättigenden Cholinkonzentrationen maximal erreichbare Strom  $I_{\max}$  variierte stark von Patch zu Patch und lag meist zwischen 5 und 30 pA. Misst man jedoch die induzierten Auswärtsströme von Cholin und verschiedenen anderen organischen Kationen in ein und derselben Messung,



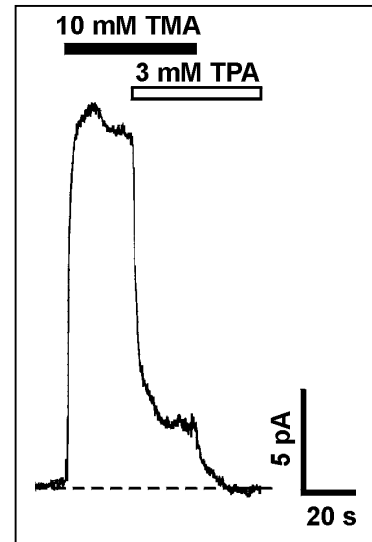
**Abb. 3.2–3 Substratkonzentrationsabhängigkeit rOCT2-vermittelter Auswärtsströme.** Gezeigt sind Stromspuren von drei „i/o“-Patchmessungen bei Zugabe von Cholin (CH) in **A**, TMA in **B** und TEA in **C** in den jeweils über den Balken angegebenen Konzentrationen. Die Bestimmung der apparenten Bindungskonstanten für Cholin (**D**,  $n = 6$ ), TMA (**E**,  $n = 4$ ) und TEA (**F**,  $n = 8$ ) geschieht durch Anpassung der Michaelis-Menten-Funktion an die Daten.

können die jeweiligen Maximalströme auf den Maximalstrom von Cholin ( $I_{\max}(\text{Cholin})$ ) normiert werden.

Für das kleine organische Kation TMA wurden analog zu Abb. 3.2–3B in vier Patchmessungen  $K_{0,5}$  und  $I_{\max}$  bestimmt (Abb. 3.2–3E). Die kinetischen Transport-Parameter ähneln mit einem maximalen Strom von  $I_{\max}(\text{TMA}) \approx 1,2 \cdot I_{\max}(\text{Cholin})$  und einer apparenten Bindungskonstante von  $K_{0,5}(\text{TMA}) = 2,7 \pm 0,3 \text{ mM}$  denen von Cholin. Für das etwas größere organische Kation TEA wurde an acht einzelnen Patchen eine Bindungskonstante von

$K_{0,5} = 0,16 \pm 0,05$  mM bei 0 mV bestimmt (siehe Abb. 3.2–3F). Damit sättigt der elektrogene Transport von TEA schon bei deutlich geringeren Konzentrationen als bei Cholin. Der bei sättigenden TEA Konzentrationen maximal erreichbare Auswärtsstrom ( $I_{\max}$ ) betrug jedoch nur ungefähr die Hälfte des durch Cholin induzierten Maximalstromes.

Die vom noch größeren organischen Kation TPA induzierten Auswärtsströme waren kleiner als zehn Prozent der durch TMA verursachten Ströme (bei 3 mM TPA und 10 mM TMA) und lagen damit nicht signifikant über den normalen Stromschwankungen. Dafür zeigte die Reduzierung des durch 10 mM TMA induzierten Stromes um achtzig Prozent bei gleichzeitiger Applikation von 3 mM TPA in Abb. 3.2–4, dass TPA einen durch rOCT2 vermittelten Transport organischer Kationen gut zu hemmen vermag. 1 mM TBA schließlich induzierte keinen messbaren Auswärtsstrom, inhibierte aber den Strom von 10 mM TMA um etwa zwei Drittel (siehe Abb. 3.2–1C). Beim Vergleich der strukturell ähnlichen Substanzen Cholin, TMA, TEA, TPA und TBA lässt sich beobachten, dass mit zunehmender Größe der Seitenketten von TMA über Cholin, TEA und TPA zu TBA die Transport-Rate durch rOCT2 abnimmt. Die Affinität zu rOCT2 nimmt gleichzeitig von TMA über Cholin zu TEA zu.

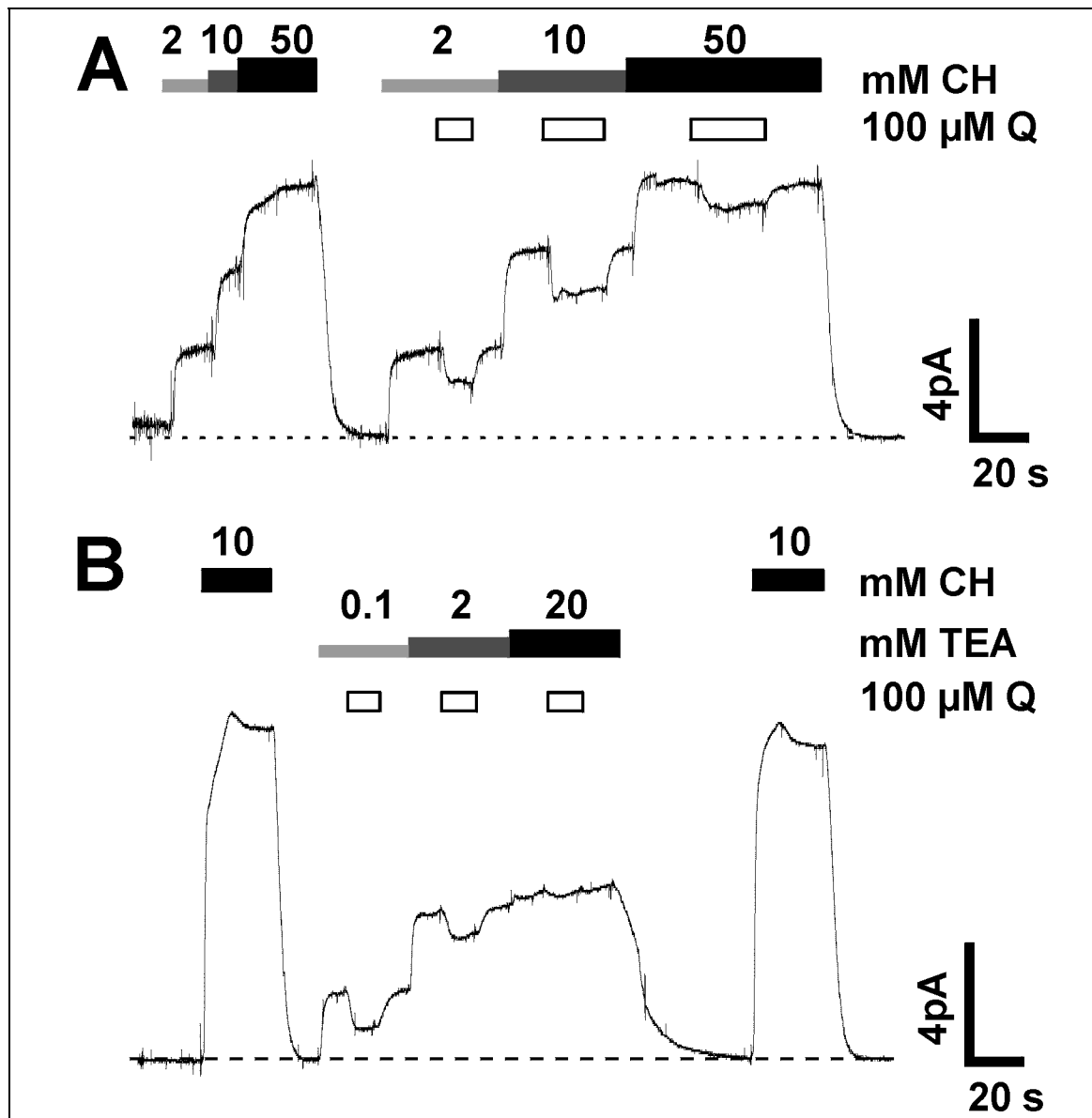


**Abb. 3.2–4 Hemmung des durch 10 mM TMA vermittelten Auswärtsstromes durch 3 mM TPA.**

#### **3.2.1.4 Kompetitive Hemmung durch zytoplasmatisch zugeführtes Chinin**

Die in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen „voltage clamp“-Experimente und weitere Messungen an ganzen, rOCT2 exprimierenden Zellen (Arndt *et al.* 2001) haben gezeigt, dass Chinin, von der extrazellulären Membranseite bei pH 7,4 zugeführt, einen einwärts gerichteten Transport von Substrat durch rOCT2 nichtkompetitiv hemmen kann. Die Hemmung erfolgte mit einer apparenten Inhibierungskonstante ( $K_i$ ) von  $\sim 10$   $\mu$ M, die bei niedrigerem pH-Wert größer und bei höherem pH-Wert kleiner wurde. Dieser Effekt könnte damit erklärt werden, dass Chinin in seiner ungeladenen Form über die Plasmamembran diffundiert und den Transport von der zytoplasmatischen Seite aus zu hemmen vermag. Eine nähere Untersuchung der Hemmung von der zytoplasmatischen Seite aus in „patch clamp“-Experimenten erschien daher wünschenswert.





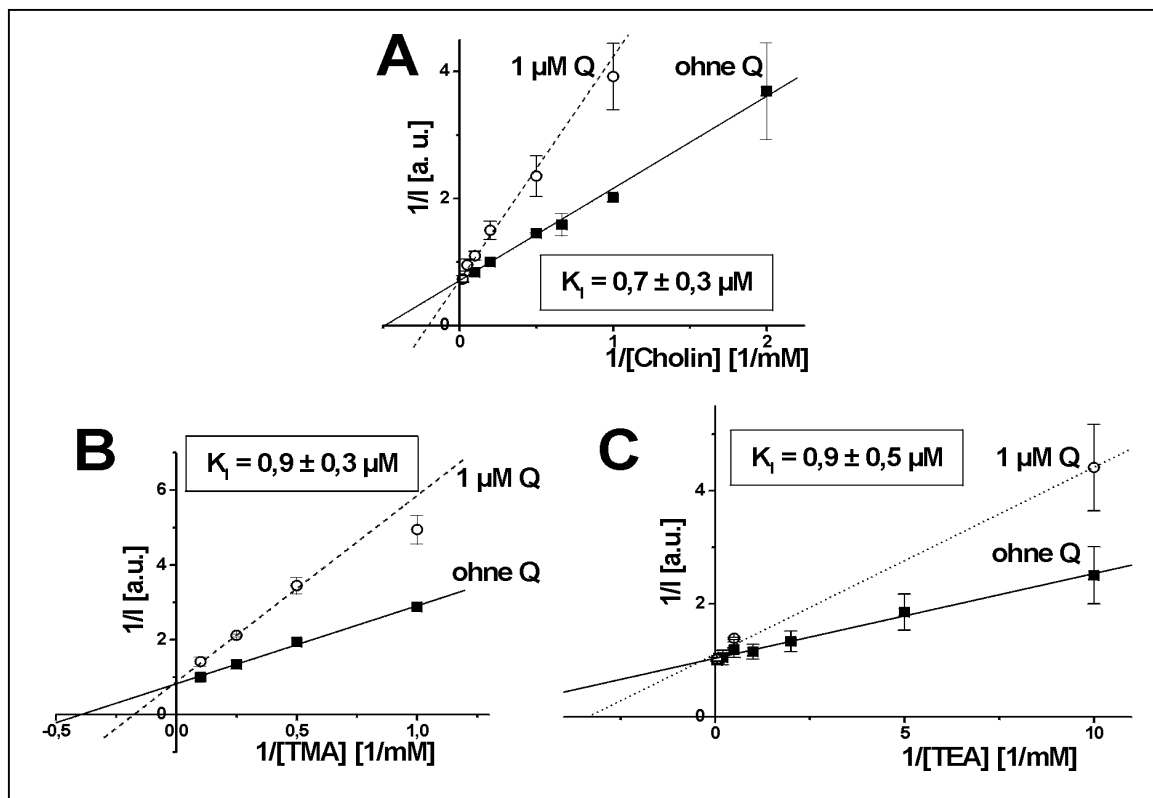
**Abb. 3.2–5 Kompetitive Hemmung von Cholin- und durch TEA induzierten elektrischen Auswärtsströmen durch Chinin.** Die Balken kennzeichnen die Zugabe von 2; 10 und 50 mM Cholin (CH) in **A**, 0,1; 2 und 20 mM TEA in **B** oder 1  $\mu$ M Chinin (Q) in **A** und **B**.

„patch clamp“-Experimente in „i/o“-Konfiguration eignen sich gut, um den Mechanismus der Hemmung durch Chinin von der zytoplasmatischen Membranseite aus zu untersuchen. An „inside out“-Patchen wurden deshalb durch Cholin, TEA und TMA induzierte Auswärtsströme in An- und in Abwesenheit von Chinin gemessen und verglichen. Wie in Abb. 3.2–10A zu sehen ist, konnte der durch 5 mM Cholin verursachte Auswärtsstrom durch intrazelluläre Zugabe von 1, 10 oder 100  $\mu$ M Chinin jeweils um 50 %, 90 % oder fast 100 % verringert werden. Die apparente Inhibierungskonstante in Anwesenheit von 5 mM Cholin wurde zu  $K_i(5CH) = 1,1 \pm 0,2 \mu$ M bestimmt. Für eine kompetitiven Inhibierungsmechanismus ist

$$K_I([CH]) = K_I + K_I \cdot [CH] \cdot \{K_m(CH)\}^{-1}, \quad (9)$$

also ergibt sich aus dieser Messung  $K_I = 0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ . Dass dieser Inhibierungstyp bei der Hemmung des cholininduzierten Ausstroms von der zytoplasmatischen Seite mit Chinin tatsächlich vorliegt, wird aus den folgenden Resultaten ersichtlich.

Abb. 3.2–5A zeigt die Konzentrationsabhängigkeit des Auswärtsstromes bei Zugabe von 2, 10 und 50 mM Cholin in Ab- und in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Chinin. Offensichtlich ist die Abnahme des Stromes in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Chinin bei 50 mM Cholin prozentual geringer als bei 2 oder 10 mM Cholin. Eine ähnliche Messung für TEA als transportiertes Kation ist in Abb. 3.2–5B gezeigt. Hier hatte die Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  Chinin so gut wie keinen Effekt auf den durch 20 mM TEA induzierten Strom, hemmte aber den von  $0,1 \mu\text{M}$  TEA verursachten Strom um  $\sim 50\%$ . Diese Beobachtung legt eine kompetitive Hemmung durch Chinin von der zytoplasmatischen Seite aus nahe. Die in Abb. 3.2–6 gezeigten Lineweaver-Burk-Diagramme für gemittelte Messungen des Auswärtsstromes bei Zugabe von Cholin,



**Abb. 3.2–6 Lineweaver-Burk-Diagramme für die Hemmung des Ausstromes von Cholin, TMA und TEA durch Chinin.** „i/o“-Patches wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Cholin (A), TMA (B) und TEA (C) in Anwesenheit (Kreise) oder Abwesenheit (Quadrat) von  $1 \mu\text{M}$  Chinin perfundiert. Die erhaltenen Ströme von 12 (A), 4 (B) oder 11 (C) gemittelten Messungen wurden doppelt-reziprok gegen die Konzentrationen aufgetragen. An die Daten in Anwesenheit und in Abwesenheit von Chinin wurden Regressionsgeraden angepasst. Die Schnittpunkte der Geraden liegen jeweils auf der y-Achse und kennzeichnen damit einen kompetitiven Hemmtyp. Die für diesen Mechanismus bestimmten  $K_I$ -Werte sind in den Abbildungen angegeben.

TEA und TMA in An- und Abwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Chinin bestätigen diese Annahme. Durch die reziproke Auftragung der Ströme und Substratkonzentrationen werden die jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Chinin gemessenen Daten linearisiert. Die Regressionsgeraden für An- und Abwesenheit von Chinin schneiden sich für alle drei Substrate nahe der Ordinaten. Dies bedeutet, dass die Maximalströme (bei sättigenden Substratkonzentrationen) in An- und Abwesenheit von Chinin gleich hoch sind und ein kompetitiver Inhibierungsmechanismus vorliegt. Man erhält für die kompetitive Hemmung des Auswärtsstromes durch zytoplasmatisch zugeführtes Chinin apparente Inhibierungskonstanten von  $K_I(\text{Cholin}) = 0,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $K_I(\text{TEA}) = 0,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$  und  $K_I(\text{TMA}) = 0,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ .

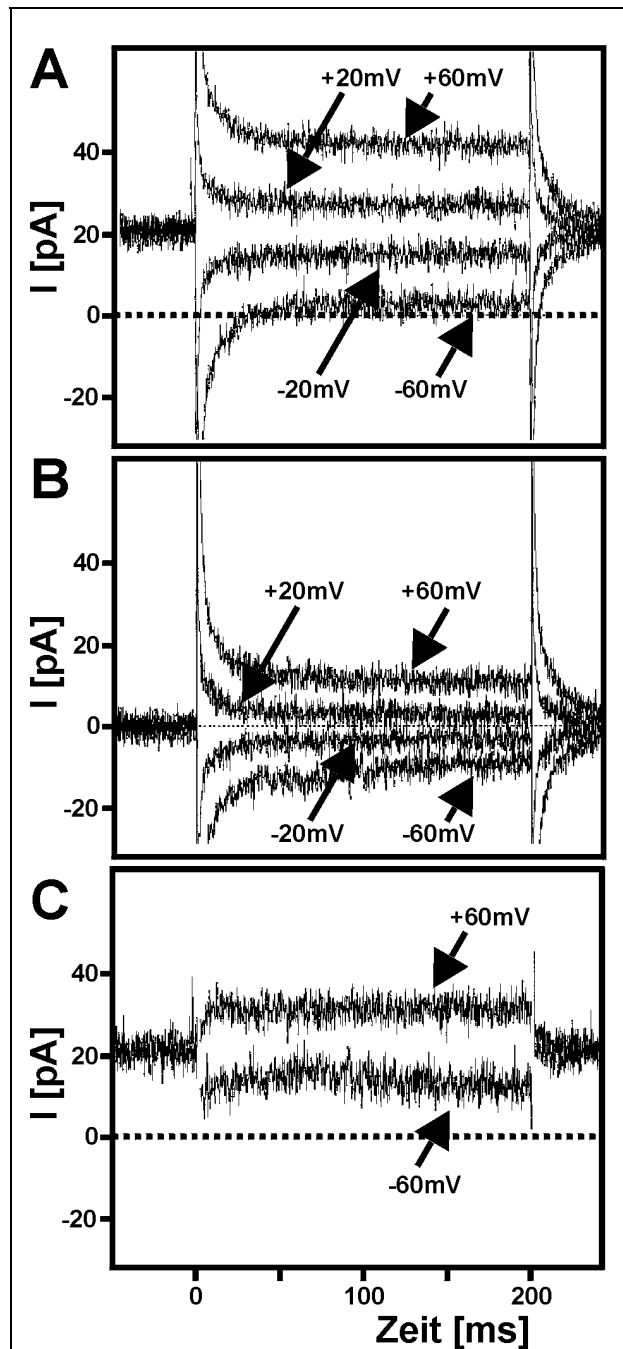
### 3.2.1.5 Spannungsabhängigkeit der Auswärtsströme

Um die Spannungsabhängigkeit der durch organische Kationen verursachten Auswärtsströme zu untersuchen, wurden 200 ms lange Spannungspulse zu verschiedenen Membranpotenzialen zwischen  $-60 \text{ mV}$  und  $+60 \text{ mV}$  an die Patchmembran angelegt. Eine typische Messung der dabei aufgenommenen Auswärtsströme zeigt Abb. 3.2–7. Die Spannungspulse wurden in 20 mV Schritten von  $-60 \text{ mV}$  bis  $+60 \text{ mV}$  einmal in Anwesenheit (Abb. 3.2–7A) und dann in Abwesenheit (Abb. 3.2–7B) von 5 mM Cholin an die Patchmembran angelegt. Die Differenz dieser Ströme ergibt in Abb. 3.2–7C die durch Cholin induzierten, rOCT2-vermittelten Auswärtsströme bei verschiedenen Potenzialen. Trägt man diese Ströme in Abhängigkeit des Potenzial auf, so erhält man sogenannte Strom-Spannungskennlinien („I/U“-Kennlinien). Die „I/U“-Kennlinien in Abb. 3.2–8 für verschiedene Konzentrationen von Cholin sind nahezu linear und besitzen alle eine positive Steigung, das heißt der Auswärtsstrom von Cholin wird bei positivem Potenzial auf der zytoplasmatischen Seite verstärkt. Aus den Strom-Spannungskennlinien für die unterschiedlichen Cholin Konzentrationen wurde der Einfluss der Spannung auf den Maximalstrom  $I_{\text{max}}$  und die apparente Bindungskonstante  $K_{0,5}$  bestimmt. Beide Parameter sind spannungsabhängig. Abb. 3.2–8 zeigt die Spannungsabhängigkeit von  $I_{\text{max}}$  und  $K_{0,5}$  für die gemittelten Werte von drei Messungen.  $I_{\text{max}}$  ist im untersuchten Spannungsbereich linear und zeigt keine Sättigung. Mit der Anpassung einer mono-exponentiellen Funktion mit dem Exponenten  $+U/U_\delta$  an die Bindungskonstante  $K_{0,5}(U)$  bei verschiedenen Membranpotenzialen  $U$  kann ein Maß  $\delta$  für ihre Spannungsabhängigkeit gefunden werden (Läuger 1991). Dabei ist

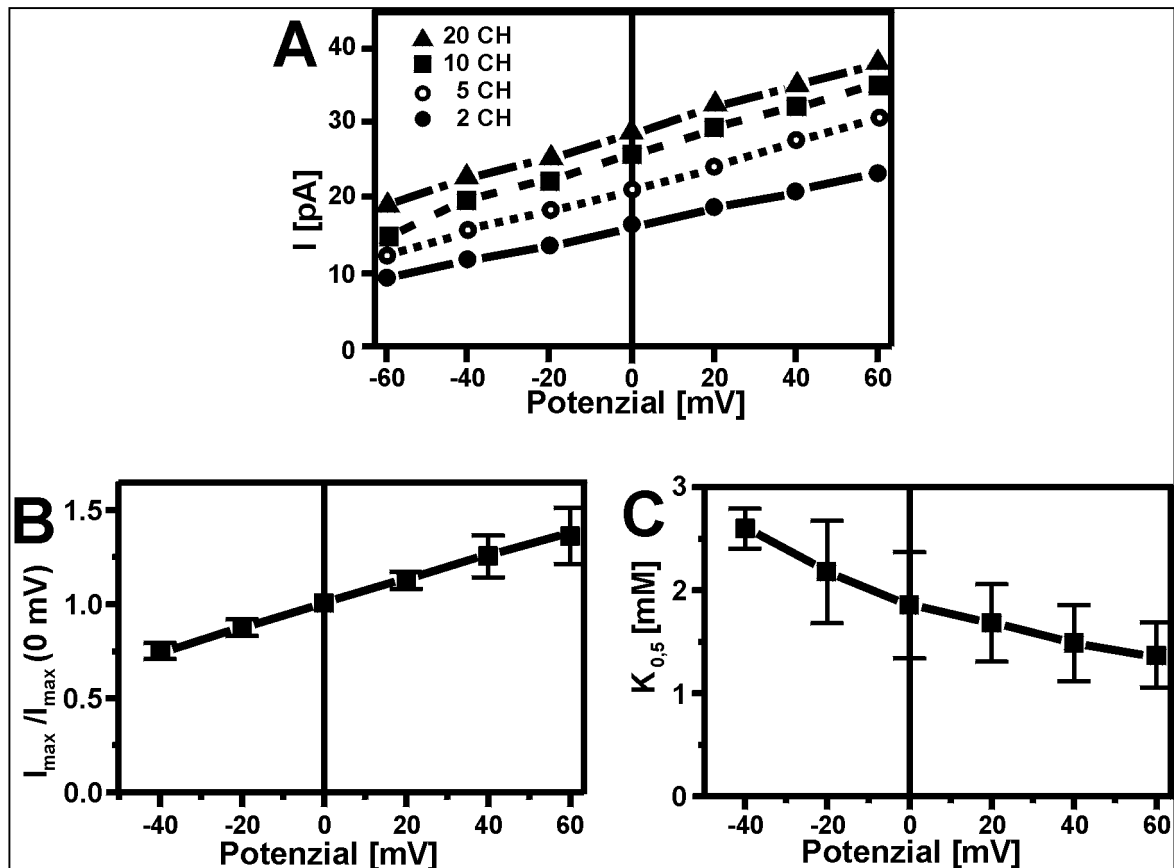
$$U_\delta = R \cdot T \cdot (z \cdot \delta \cdot F)^{-1}, \quad (10)$$

mit  $R \cdot T \cdot (z \cdot F)^{-1} = 25,4 \text{ mV}$  bei  $25^\circ \text{C}$ . Die angepasste Exponentialfunktion für Cholin zwischen  $-40$  und  $+60 \text{ mV}$  ergibt nach Gleichung (10) einen Anteil  $\delta = 0,4 \pm 0,1$  der bei dem durch die apparente Bindungskonstante ausgedrückten Prozess verschobenen Teilladung, was auf eine mäßige Spannungsabhängigkeit hindeutet. Nicht gezeigte Daten weisen darauf hin, dass der Maximalstrom  $I_{\text{max}}$  auch bei einer Erweiterung des Spannungsbereichs auf  $-80$  bis  $+80 \text{ mV}$  noch linear ist. Tendenziell steigen die Werte für  $K_{0,5}$  bei Potenzialen unter  $-40 \text{ mV}$  stark an, allerdings ist diese Interpretation sehr unsicher, da eine relativ kleine Signalhöhe bei negativen Potenzialen bei der Bildung der Differenzströme große Fehler bedingt.

Analog wurde die Spannungsabhängigkeit der durch TMA und TEA induzierten Auswärtsströme bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2–9 zusammengefasst und werden später ausführlich diskutiert. Auch die durch TMA und TEA induzierten Ströme zeigen eine Spannungsabhängigkeit bezüglich der apparenten Bindungskonstanten, die sich in  $\delta(\text{TMA}) = 0,3 \pm 0,1$  beziehungsweise  $\delta(\text{TEA}) = 0,6 \pm 0,1$  niederschlägt.



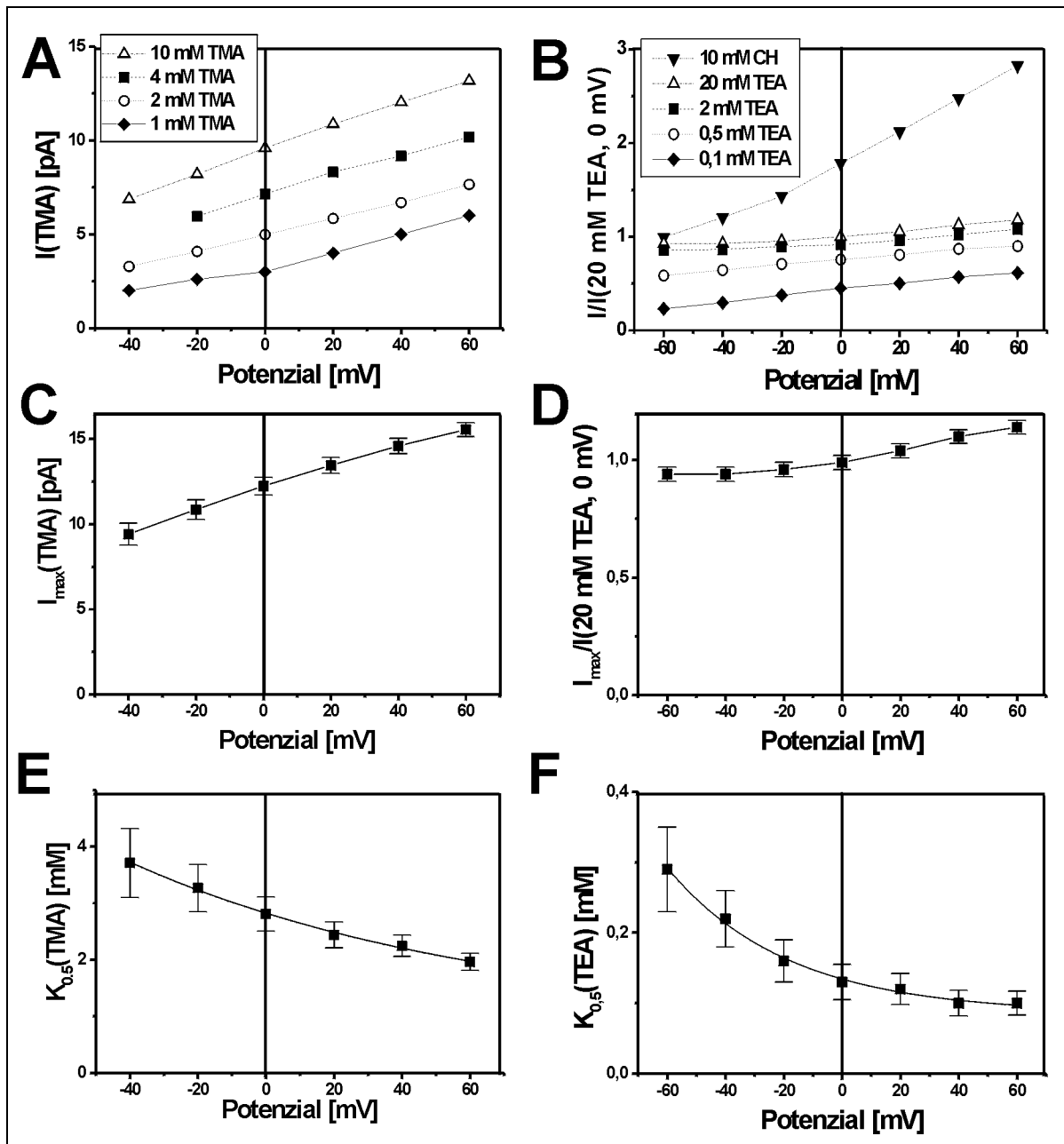
**Abb. 3.2–7 Spannungsabhängigkeit substratinduzierter Ströme.** Spannungspulse von  $-60$  bis  $+60 \text{ mV}$  und  $200 \text{ ms}$  Dauer wurden an einen „i/o“-Patch in der Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) von  $5 \text{ mM}$  Cholin angelegt. Der Übersichtlichkeit halber sind nur ausgewählte Pulse dargestellt. Die Differenzströme (Strom-Spannungskennlinien) in C wurden durch Subtraktion der entsprechenden Ströme von B minus A erhalten.



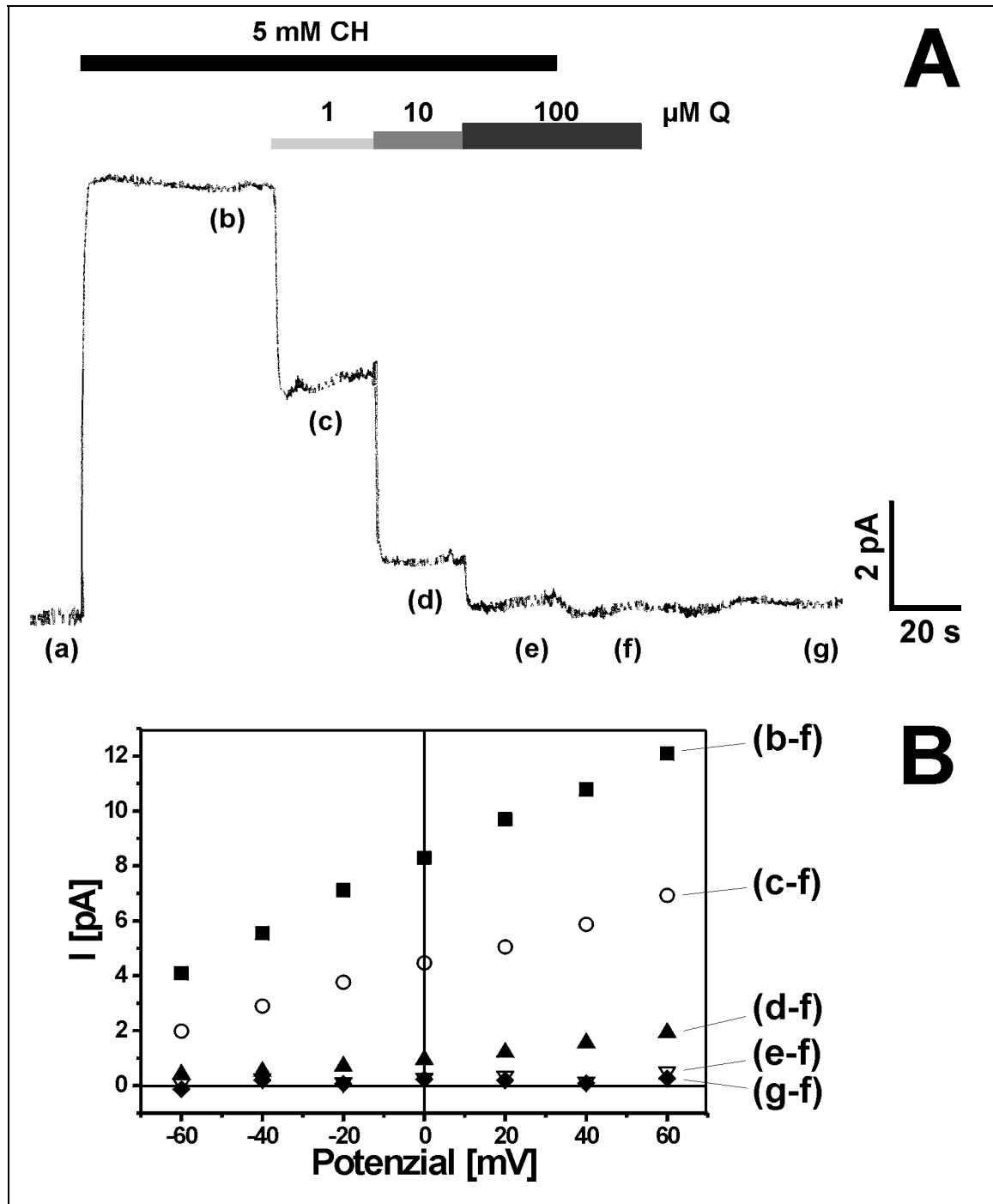
**Abb. 3.2–8 Spannungsabhängigkeit von cholininduzierten Auswärtsströmen in „i/o“-Patchen.** A: Das in Abb. 3.2–7 beschriebene Experiment wurde für verschiedene CholinKonzentrationen (2; 5; 10 und 20 mM Cholin) durchgeführt und die Gleichgewichtswerte der Differenzströme zum Erhalt von Strom-Spannungskennlinien ( $I/U$ -Kennlinien) gegen das Membranpotenzial aufgetragen.  $I_{\max}$  (B) und  $K_{0.5}$  (C) wurden für jeden Wert des Membranpotenzials jeweils durch Angleichen einer Michaelis-Menten-Funktion an die gemittelten Werte von 3 Experimenten errechnet. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Fehler des Anpassungsalgorithmus. Der Anteil  $\delta$  der beim Transport verschobenen Teilladung wurde durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion mit dem Exponenten  $+U/U_{\delta}$  mit  $U_{\delta} = R \cdot T / z \cdot \delta \cdot F$  und  $R \cdot T / z \cdot F = 25,4 \text{ mV}$  für  $25^{\circ}\text{C}$  zu  $\delta = 0,4 \pm 0,1$  ermittelt.

### 3.2.1.6 Spannungsabhängigkeit der Hemmung durch Chinin

Zu den mit kleinen Buchstaben bezeichneten Zeiten in Abb. 3.2–10A wurden jeweils Spannungspulse von 200 ms Dauer zwischen  $-60 \text{ mV}$  und  $+60 \text{ mV}$  angelegt. Anschließend wurden Differenzströme zu den in Anwesenheit von  $100 \mu\text{M}$  Chinin und Abwesenheit von Cholin auf der zytoplasmatischen Seite gemessenen Strömen bei (f) für Abb. 3.2–10B gebildet. Alle Strom-Spannungskennlinien sind im untersuchten Spannungsbereich linear. Die Kennlinien für 1, 10 und  $100 \mu\text{M}$  Chinin zeigen bei allen Spannungen einen jeweils im gleichen Verhältnis reduzierten Ausstrom gegenüber der Kennlinie ohne Chinin. Die Hemmung des durch Cholin induzierten Ausstromes durch Chinin ist also nicht spannungsabhängig.  $100 \mu\text{M}$  Chinin hemmen den durch Cholin induzierten Strom bei allen Spannungen fast vollständig (siehe (e-f)). Die Differenz (g-f) zeigt noch einmal, dass Chinin selbst keinen Strom verursacht.



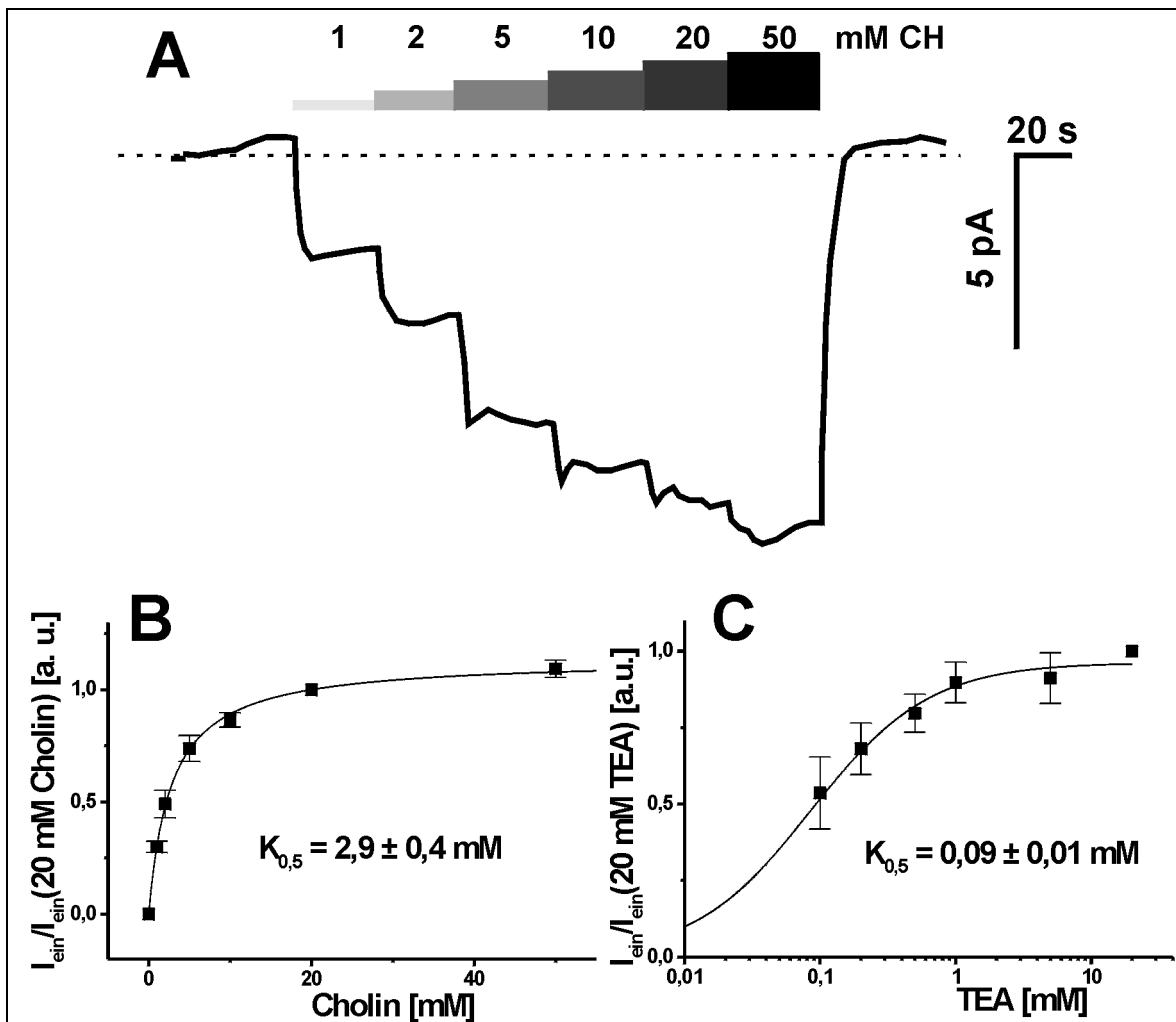
**Abb. 3.2–9** Spannungsabhängigkeit von  $I_{\text{max}}$  und  $K_{0.5}$  für durch TMA und durch TEA induzierte Ausströme. Experimente analog zu Abb. 3.2-8 mit 1; 2; 4 und 10 mM TMA (**A**) und mit 0,1; 0,5; 2; 10 und 20 mM TEA sowie 10 mM Cholin (**B**); jedoch sind in **B** aus 2 Experimenten gemittelte Daten dargestellt. In **C**, **D** und **E**, **F** sind  $I_{\text{max}}$  und  $K_{0.5}$  jeweils für die Messungen aus **A** und **B** in Abhängigkeit des Membranpotenzials dargestellt.



**Abb. 3.2-10 Hemmung des durch 5 mM Cholin vermittelten Ausstromes durch Chinin in Abhängigkeit des Membranpotenzials. A:** Auswärtsstrom bei Perfusion eines Patch mit 5 mM Cholin (CH) und 1; 10 oder 100  $\mu\text{M}$  Chinin (Q) zu den durch Balken gekennzeichneten Zeiten. Zu den mit Kleinbuchstaben bezeichneten Zeitpunkten wurden Spannungspulse zwischen  $-60$  und  $+60$  V angelegt. **B:** Strom-Spannungskennlinien der Differenzströme. Die in Klammern gesetzten Kleinbuchstaben der Differenzströme entsprechen den in **A** mit Kleinbuchstaben bezeichneten Zeiten. Die Differenzen wurden gegen Ströme in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  Chinin ohne Cholin (Zeitpunkt (f)) genommen. Die mit Quadraten gekennzeichneten Differenzströme (b-f) sind zum Beispiel durch Subtraktion der aus den Spannungspulsen zum Zeitpunkt (f) resultierenden Ströme von den korrespondierenden Strömen zum Zeitpunkt (b) entstanden.

### 3.2.2 Einfluss von extrazellulär zugeführten organischen Kationen auf den elektrischen Strom

Die im Kapitel 3.2.1 an „inside out“-Patches gewonnenen Ergebnisse für den Auswärtstransport von organischen Kationen können nicht ohne weiteres mit Ergebnissen für den Einwärts-Transport aus Zwei-Elektroden-Spannungsklemme Messungen an ganzen Zellen verglichen werden. Deshalb wurden zusätzlich Messungen an *giant membrane patches* in „outside/out“-Konfiguration durchgeführt. Die dabei gemessenen Einwärtsströme lassen sich zum einen mit den an „inside out“-Patches gemessenen Auswärtsströmen und zum anderen mit den im Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ganzen Zellen gemessenen Auswärtsströmen vergleichen.



**Abb. 3.2–11 Substratinduzierte Einwärtsströme in „o/o“-Patches.** **A:** Perfusion eines „o/o“-Patches mit 1; 2; 5; 10; 20 und 50 mM Cholin zu den mit den Balken gekennzeichneten Zeiten. **B** und **C:** Substratkonzentrationsabhängigkeit cholin- (**B**) und TEA-induzierter (**C**) Einwärtsströme in „o/o“-Patches. Zur Ermittlung der apparenten Bindungskonstanten wurde an die gemittelten Daten von 3 (**B**) und 6 (**C**) Experimenten eine Michaelis-Menten-Funktion angepasst. Pipetten- und Badlösung enthielten hohe Konzentrationen an NMG.

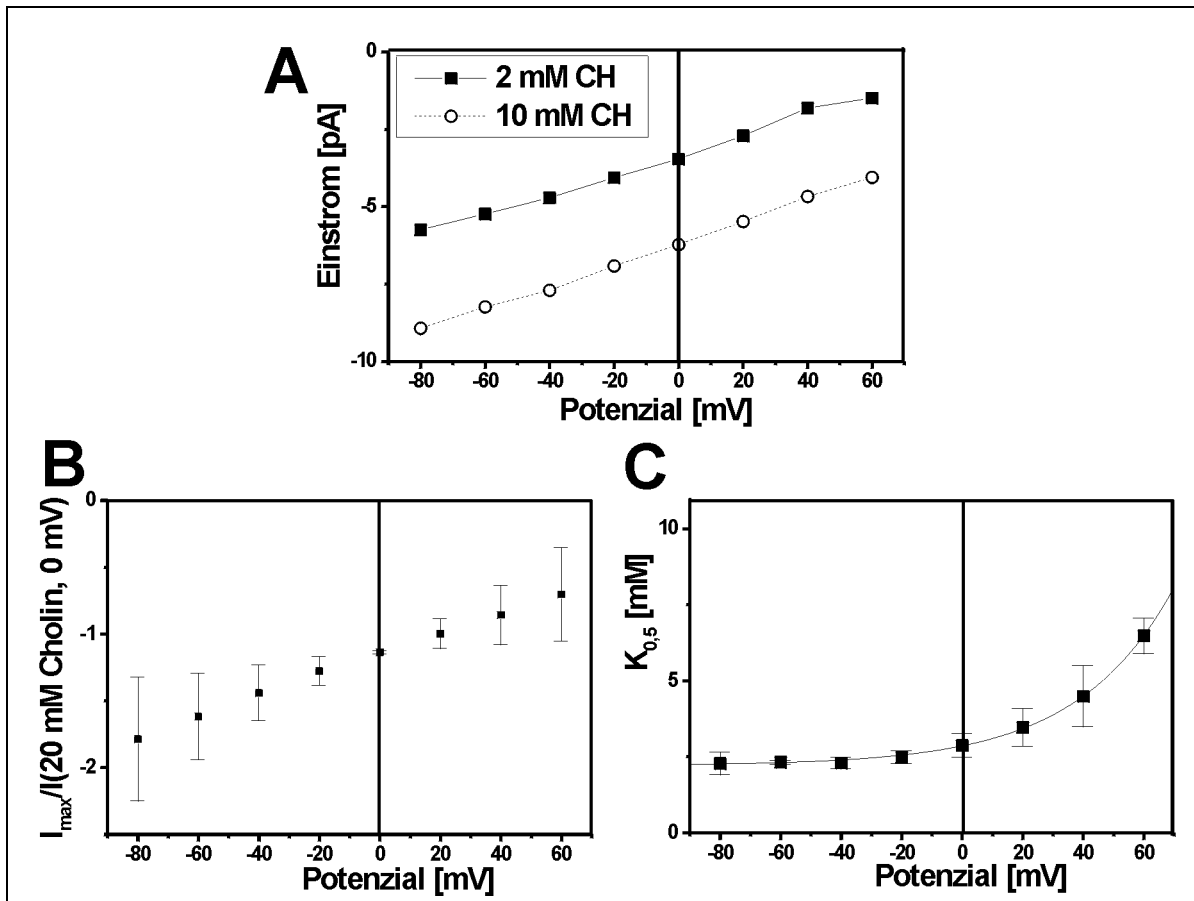


### **3.2.2.1 Substratabhängigkeit der Einwärtsströme bei Messungen in „outside out“-Konfiguration**

Parallel zu den „inside out“-Messungen in Kapitel 3.2.1.3 wurden Messungen an *giant membrane patches* in „outside out“-Konfiguration vorgenommen. Abb. 3.2–11A zeigt den Einwärtsstrom bei extrazellulärer Zugabe von Cholin in verschiedenen Konzentrationen (1; 2; 5; 10; 20 und 50 mM Cholin). Die Konzentration von 10 mM Cholin induzierte bei drei verschiedenen Messungen Einwärtsströme von 9,5; 11 und 15,5 pA. Die extrazelluläre apparente Bindungskonstante ist bei Mittelung der Ergebnisse von drei Patchen zu  $K_{0,5} = 2,9 \pm 0,4$  mM Cholin bestimmt worden (siehe Abb. 3.2–11B). Analog wurde die apparente Bindungskonstante für TEA an sechs „outside out“-Patchen zu  $K_{0,5} = 0,09 \pm 0,01$  mM TEA bestimmt (siehe Abb. 3.2–11C; verwendete TEA Konzentrationen: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5 und 20 mM TEA). Der Maximalstrom bei sättigenden TEA-Konzentrationen betrug ~50 % des maximal mit Cholin induzierbaren Stroms.

### **3.2.2.2 Spannungsabhängigkeit der Einwärtsströme bei Messungen in „outside out“-Konfiguration**

Um die Spannungsabhängigkeit der durch organische Kationen verursachten Einwärtsströme zu untersuchen, wurden analog zu den in Kapitel 3.2.1.5 beschriebenen Messungen 200 ms lang dauernde Spannungspulse zu verschiedenen Membranpotenzialen zwischen –80 und +60 mV an die Patchmembran angelegt. Die resultierenden Strom-Spannungs-Kennlinien für verschiedene Cholinkonzentrationen sind wie in Abb. 3.2–12A gezeigt praktisch linear und besitzen eine positive Steigung. Vergleicht man die Kennlinien der Einwärtsströme mit denen der in „i/o“-Konfiguration gemessenen Auswärtsströme (siehe Abb. 3.2–8A), so stellt man fest, dass sie sich symmetrisch zum Ursprung (0 mV Membranpotenzial und kein Ein- oder Auswärtsstrom) verhalten. Die Spannungsabhängigkeit der apparenten Bindungskonstante und des Maximalstromes (bezogen auf den Maximalstrom bei 0 mV) wurden anhand von drei „outside out“-Patchmessungen und Cholinkonzentrationen von 1, 2, 5, 10 und 20 mM ermittelt (siehe Abb. 3.2–12B und C). Die bei dem Transport verschobene Teilladung wurde durch Anpassung einer Exponentialfunktion an die apparenten Bindungskonstanten bei verschiedenen Membranpotenzialen nach Gleichung (10) zu  $\delta = 0,8 \pm 0,1$  errechnet. Ein Vergleich mit Abb. 3.2–8 zeigt, dass  $K_{0,5}$  und  $I_{\max}$  ebenfalls sehr symmetrisch sind.



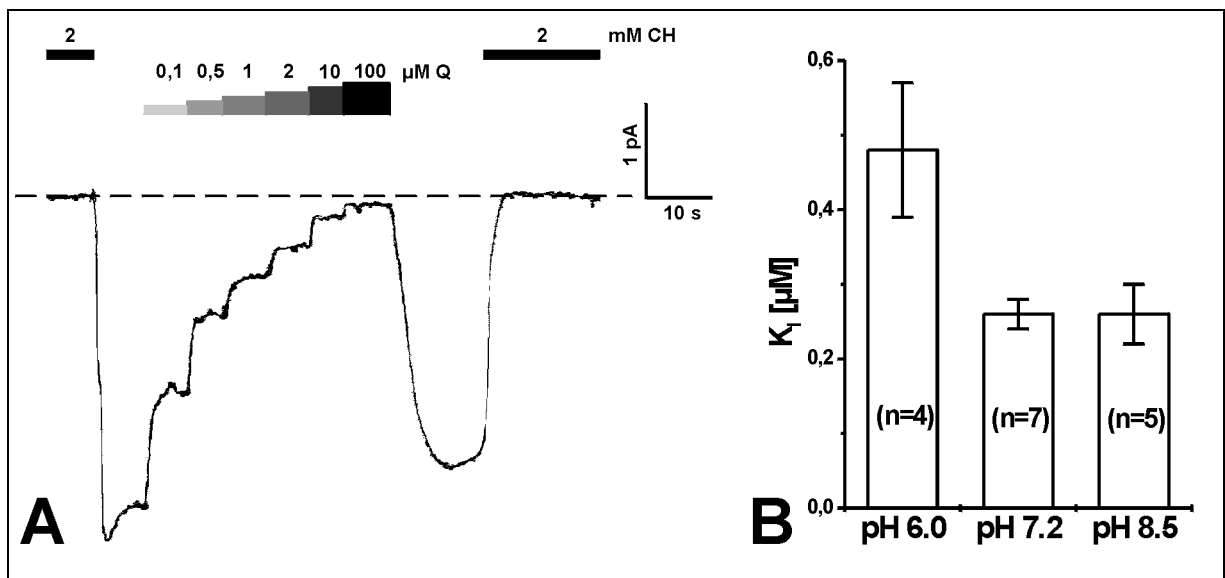
**Abb. 3.2–12 Spannungsabhängigkeit von durch Cholin induzierten Einwärtsströmen in „o/o“-Patchen.** Experimente analog zu Abb. 3.2–8, jedoch in „o/o“-Konfiguration. Die in **A** für 2 und 10 mM Cholin gezeigten Einwärtsströme einer Einzelmessung sind punktsymmetrisch zu den in Abb. 3.2–8A gezeigten Auswärtsströmen. **B** und **C**: Bestimmung von  $I_{\max}$  und  $K_{0.5}$  aus den gemittelten Daten von 3 Experimenten bei Perfusion mit 1; 2; 5; 10 und 20 mM Cholin.  $I_{\max}$  wurde auf den von 20 mM Cholin bei 0 mV verursachten Strom normiert.

### 3.2.3 Strommessungen bei Vorbeladung der Pipette mit organischen Kationen

In den folgenden Experimenten wurde die Patchpipette mit von rOCT2 transportierten organischen Kationen in wohldefinierten Konzentrationen beladen. Das entspricht bei Patchen in „inside out“-Konfiguration einer Substratapplikation auf der extrazellulären Seite und bei Patchen in „outside out“-Konfiguration einer auf der zytoplasmatischen Seite. Bei Perfusion des Bades mit substrat- oder inhibitorhaltigen Lösungen konnte dadurch der Transport organischer Kationen durch rOCT2 unter Bedingungen untersucht werden, bei denen auf beiden Seiten der Plasmamembran Substrate oder Inhibitoren anwesend sind. Insbesondere wurde durch geeignete Wahl der Substratkonzentrationen auf beiden Seiten der Patchmembran der Effekt von verschiedenen Substrat-Konzentrationsgradienten über die Patchmembran auf den elektrischen Strom näher studiert.

### 3.2.3.1 Trans-Inhibierung des Einstromes organischer Kationen von der zytoplasmatischen Seite

Abb. 3.2–13 zeigt den elektrischen Strom einer Patchmessung in „i/o“-Konfiguration bei 0 mV und Beladung der Patchpipette mit Badlösung plus 2 mM Cholinchlorid. Bei Perfusion des Bades mit 2 mM Cholinchlorid haben Pipetten- und Badlösung die exakt gleiche Zusammensetzung, was im Folgenden mit „symmetrische Bedingungen“ bezeichnet werden soll. Der Cholin Konzentrationsgradient über die Membran ist dabei null, und damit verschwindet bei 0 mV auch die treibende Kraft für den Cholintransport. Der unter symmetrischen Bedingungen fließende elektrische Strom ist dann ebenfalls gleich null<sup>3</sup> (gestrichelte Linie in Abb. 3.2–13A). Bei Perfusion des Bades mit substratfreier Lösung misst man einen negativen elektrischen Strom, das heißt einen Einwärtsstrom, der durch das in der Pipette – extrazellulär – vorhandene Cholin verursacht wird. Die Zugabe von Chinin zum



**Abb. 3.2–13 Trans-Inhibierung des durch Cholin induzierten Einwärtsstromes durch Chinin.** **A:** Die Pipette wurde (extrazellulär) mit 2 mM Cholin vorbeladen. Badseitige (zytoplasmatische) Zugabe von 2 mM Cholin und verschiedenen Konzentrationen von Chinin zu den mit Balken gekennzeichneten Zeiten. Der bei symmetrischen Bedingungen (beidseitig 2 mM Cholin) fließende Strom ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet und liegt im Bereich von wenigen pA zu null elektrischem Strom. Durch 100  $\mu$ M Chinin kann der durch Cholin induzierte Einwärtsstrom fast komplett trans-inhibiert werden. **B:** pH-Abhängigkeit der Trans-Inhibierung. Bei verschiedenen pH-Werten (unter Verwendung der Bad- und Pipettenlösungen Sym(pH6,0), Sym(pH7,4) und Sym(pH8,5)) wurden Experimente analog **A** durchgeführt und die apparenten Inhibierungskonstanten  $K_i$  ermittelt. Aufgetragen sind die gemittelten Ergebnisse von 4 (pH 6,0), 7 (pH 7,4) und 5 (pH 8,5) Experimenten.

<sup>3</sup> Der gemessene (absolute) elektrische Strom kann bis zu einigen pA in die eine oder andere Richtung betragen, abhängig vom Nullabgleich des Stromes mit leerer Pipette, von den Diffusionspotenzialen an Pipetten- und Badelektrode, von einer Stromdrift durch Leckströme oder leichten Unterschieden in der Substratkonzentration auf Bad- und Pipettenseite.

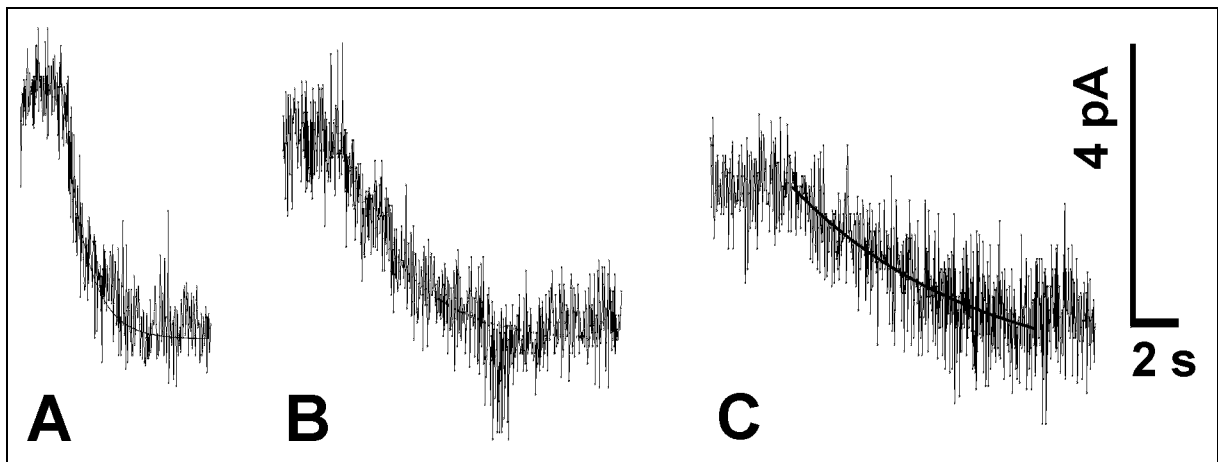
Bad, also von der zytoplasmatischen Seite aus, vermindert den elektrischen Einwärtsstrom in Abhängigkeit der Chininkonzentration. 100  $\mu\text{M}$  Chinin hemmen den Einstrom praktisch vollständig. Dies liefert gleichzeitig eine Bestätigung für die Nullsetzung des elektrischen Stromes unter symmetrischen Bedingungen. Da das Substrat Cholin von der extrazellulären und der Inhibitor Chinin von der intrazellulären Seite aus appliziert werden, kann man von einer „Trans-Inhibierung“ sprechen. Zur Ermittlung der apparenten Inhibierungskonstante  $K_I$  wurden zu dieser Messung analoge Messungen mit unterschiedlicher Vorbeladung der Pipette durchgeführt. Zwei Messungen mit 2 mM Cholinchlorid in der Pipette ergeben bei Mittelung der Einzelergebnisse  $K_I = 0,25 \pm 0,04 \mu\text{M}$ , vier Messungen mit 5 mM Cholinchlorid  $K_I = 0,26 \pm 0,04 \mu\text{M}$  und eine Messung mit 2 mM TEA-Cl  $K_I = 0,25 \pm 0,06 \mu\text{M}$ . Die  $K_I$ -Werte sämtlicher Messungen sind im Rahmen der Fehler gleich. Eine Mittelung aller sieben Einzelergebnisse ergibt  $K_I = 0,26 \pm 0,02 \mu\text{M}$ .

### 3.2.3.1.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Trans-Inhibierung

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Hemmung des Substrat-Einstromes durch zytoplasmatisch appliziertes Chinin zu untersuchen, wurden „patch clamp“-Experimente in „i/o“-Konfiguration durchgeführt, bei denen die Patchpipette zuvor mit 2 mM Cholinchlorid oder 2 mM TEA-Cl vorbeladen und der pH von Bad- und Pipettenlösung jeweils auf 7,4; 6,0 oder 8,5 eingestellt wurde. Der elektrische Strom wurde analog der Messung in Abb. 3.2–13A bei verschiedenen Chininkonzentrationen im Bad und 0 mV Membranpotenzial gemessen und die apparente Inhibierungskonstante  $K_I$  bestimmt. In Abb. 3.2–13B ist eine Zusammenfassung der Messungen bei verschiedenen pH-Werten zu sehen. Der  $K_I$  ist bei pH 6,0 mit  $K_I = 0,48 \pm 0,09 \mu\text{M}$  höher als bei pH 7,4 ( $K_I = 0,26 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) und pH 8,5 ( $K_I = 0,26 \pm 0,04$ ). Die Trans-Inhibierung des Substrat-Einstromes durch zytoplasmatisch zugeführtes Chinin ist, wenn überhaupt, nur leicht pH-abhängig bei pH-Werten zwischen pH 6,0 und pH 8,5. Es ist zu beachten, dass der bei pH 6,0 bestimmte Wert mit einiger Unsicherheit verbunden ist, da die bei niedrigem pH-Wert gemessenen elektrischen Ströme verrauscht waren und keine sichere Bestimmung der Grundlinie möglich war. Chinin liegt mit einem pK-Wert von  $\sim 8,4$  (Notterman *et al.* 1986) bei pH 8,4 zu 50 % in der gut membrangängigen ungeladenen Form (Q) und 50 % in der geladenen Form ( $\text{QH}^+$ ) vor; bei pH 7,4 ist  $\sim 10$  % des Chinins ungeladen und bei pH 6,0 weniger als  $\sim 1$  %. Auf die sich daraus ergebenden Konsequenzen wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

### 3.2.3.1.2 Anstiegszeit des elektrischen Stromes nach vorausgegangener Hemmung

Nach fast vollständiger Hemmung von durch rOCT2 vermittelten Strömen durch 100  $\mu\text{M}$  Chinin oder 1,5 mM IBMX konnte beim anschließenden Auswaschen des Inhibitors beobachtet werden, dass die Erholungszeit für die durch Substrat induzierten Ströme von dem zuvor applizierten Inhibitor abhängig war. In Abb. 3.2–14 wird bei Vorbeladung der Pipette mit 3 mM TMA der durch TMA induzierte Einstrom durch Wegnahme von 3 mM TMA aus dem Bad gezeigt, wobei in der Badlösung vor der Wegnahme des TMA bei A kein Inhibitor, bei B 1,5 mM IBMX und bei C 100  $\mu\text{M}$  Chinin im Bad anwesend war. Die Erholungszeit für den durch TMA induzierten Einstrom verlängerte sich von  $\sim 1$  s ohne vorherige Inhibierung auf  $\sim 3$  s nach Inhibierung mit IBMX und  $\sim 8$  s mit Chinin. Bei den meisten Messungen lagen die Erholungszeiten in der Regel bei 0,5–2 s ohne Inhibitor, 1–3 s mit IBMX und 8–45 s mit Chinin. Die Erholungszeiten von 0,5–2 s spiegeln dabei die Geschwindigkeit des Lösungswechsels wieder.



**Abb. 3.2–14 Erholungszeit durch TMA induzierter Einwärtsströme nach Wegnahme von intrazellulärem TMA, IBMX oder Chinin.** Bei einer Patchmessung in „i/o“-Konfiguration unter Vorbeladung der Pipette mit 3 mM TMA wurde das Bad (auf der zytoplasmatischen Seite) mit 3 mM TMA in Abwesenheit eines Inhibitors (**A**) oder in Anwesenheit von 1,5 mM IBMX (**B**) oder 100  $\mu\text{M}$  Chinin (**C**) perfundiert. Es folgte jeweils die Wegnahme von TMA und von den Inhibitoren durch Spülung des Bades mit substratfreier Lösung. Die anschließende Erholung des Einstromes von TMA wurde mit monoexponentiellen Funktionen angepasst. Es ergaben sich folgende Zeitkonstanten:  $\tau(\text{TMA}) = 0,9 \pm 0,1$  s;  $\tau(\text{IBMX}) = 2,8 \pm 0,2$  s und  $\tau(\text{Chinin}) = 8 \pm 2$  s.

### 3.2.3.2 Einfluss von Substrat-Konzentrationsgradienten auf den elektrischen Strom

In diesem Kapitel wird gezeigt werden, dass für den Cholintransport über die Plasmamembran bei 0 mV allein der einwärtsgerichtete<sup>4</sup> elektrochemische Gradient des Cholins als treibende Kraft verantwortlich ist.

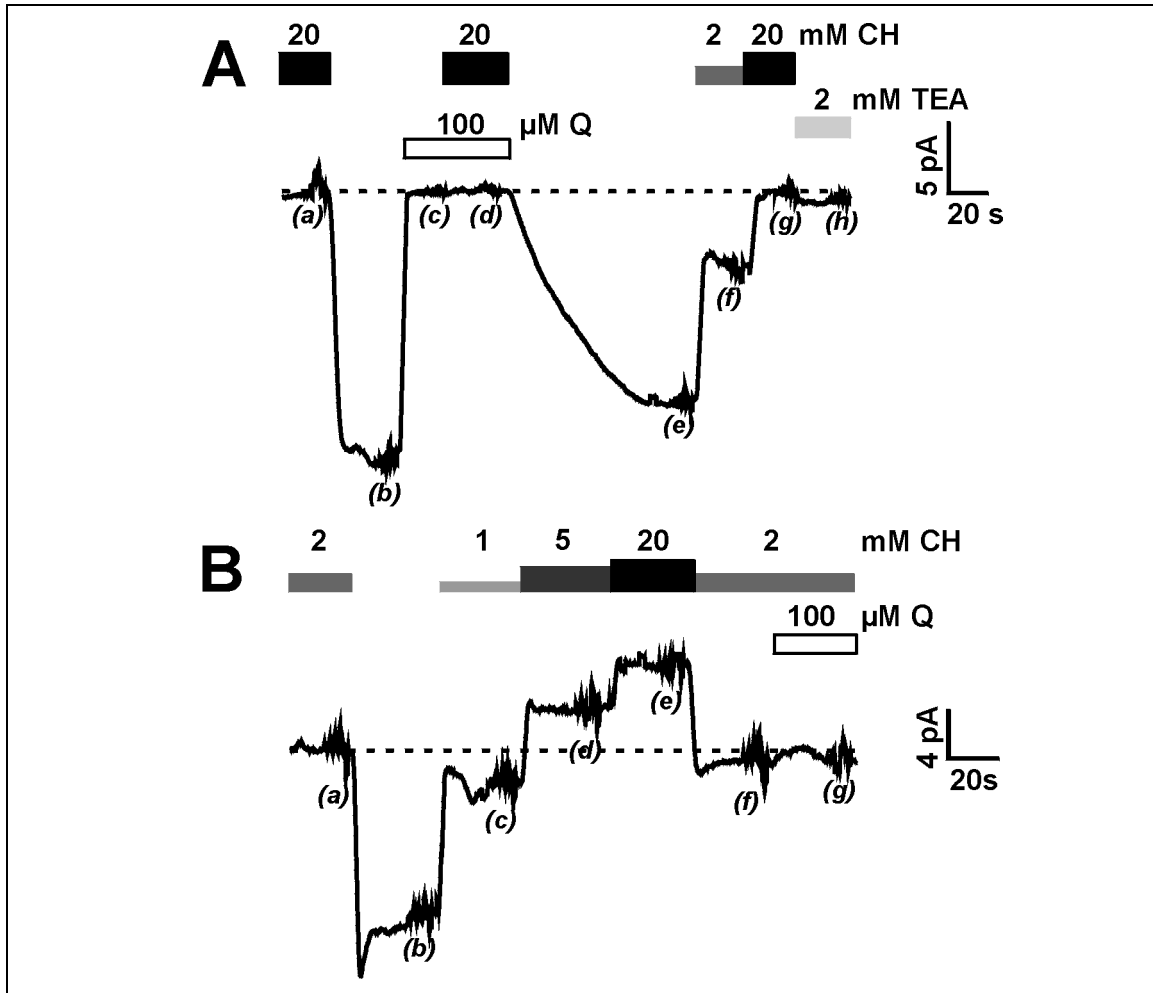
#### 3.2.3.2.1 Vorbeladung der Pipette mit Cholinchlorid

Abb. 3.2–15 zeigt den elektrischen Strom von zwei Patchmessungen in „i/o“-Konfiguration bei 0 mV und Beladung der Patchpipette mit Cholinchlorid in fast sättigender (20 mM) oder in halbsättigender Konzentration (2 mM). Bei Perfusion des Bades mit substratfreier Lösung misst man wie auch schon bei der Messung in Abb. 3.2–13A gezeigt einen negativen elektrischen Strom (Einwärtsstrom), der durch das in der Pipette extrazellulär vorhandene Cholin verursacht wird. Wenn man die Patche in Abb. 3.2–15 mit Cholinchlorid perfundiert, vermindert man jeweils den Cholinkonzentrationsgradienten und erhält einen Rückgang des Einwärtsstromes. Je höher die applizierte Cholinkonzentration ist, desto positiver wird der gemessene Strom. Bei Zugabe von Cholinchlorid in derselben Konzentration im Bad wie in der Pipette, das heißt unter symmetrischen Bedingungen, ist der chemische Gradient null und damit verschwindet bei 0 mV auch die treibende Kraft für den Cholintransport: Der unter symmetrischen Bedingungen gemessene elektrische Strom bei 0 mV ist genau so hoch wie bei Zugabe von 100 µM Chinin. Da die intrazelluläre Applikation von Chinin den Cholin-Einstrom praktisch vollständig inhibiert (siehe Kapitel 3.2.3.1), kann jeder in dieser Höhe gemessener Strom als Strom interpretiert werden, bei dem netto keine Ladung durch rOCT2 transportiert wird. Daraus folgt, dass die Ein- und Auswärtsströme von Cholin unter symmetrischen Bedingungen sich gegenseitig aufheben. Dies wird in Abb. 3.2–15 jeweils durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht. Ströme unterhalb der gestrichelten Linie sind in Bezug auf den durch rOCT2 vermittelten Kationentransport Einwärtsströme, Ströme oberhalb Auswärtsströme. Dementsprechend verursachen einwärtsgerichtete Cholinkonzentrationsgradienten Einwärts- und auswärtsgerichtete Gradienten Auswärtsströme. Abb. 3.2–15A zeigt außerdem bei Auswaschung des Chinins die mit einer

---

<sup>4</sup> Analog zur Konvention, dass ein Strom positiver Ionen über die Plasmamembran von der extrazellulären zur intrazellulären Seite als (elektrisch negativer) Einwärtsstrom definiert ist (siehe Kapitel 2.4.3), soll eine extrazellulär höhere Konzentration organischer Kationen (und zytoplasmatisch niedrigere) als einwärtsgerichteter Kationen-Konzentrationsgradient bezeichnet werden.

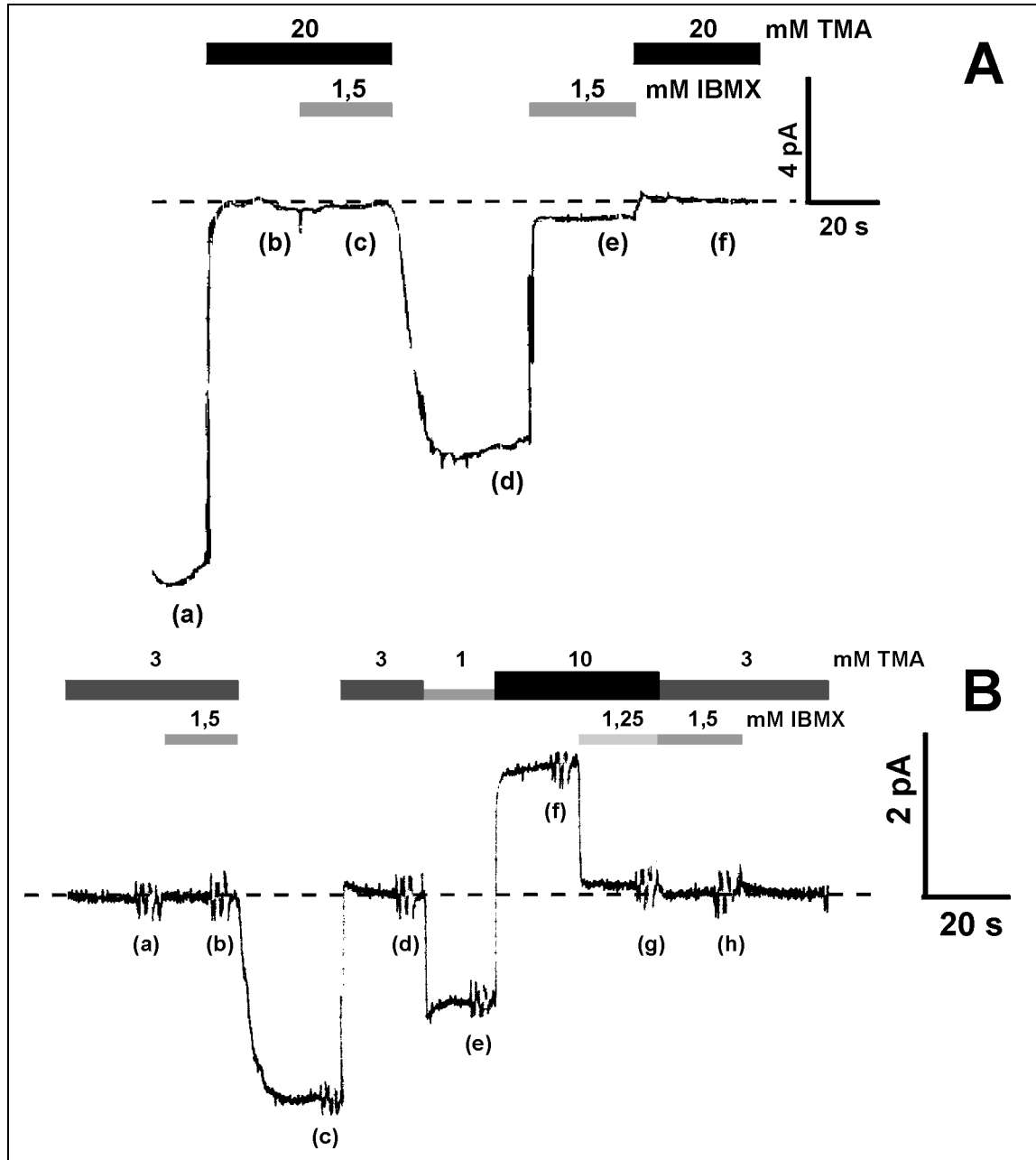
Zeitkonstante  $\tau = 38$  s relativ langsame Erholung des durch Cholin induzierten Einstromes und bedingt durch den *rundown* ein geringeres Stromsignal. Die badseitige Zugabe von (sättigenden) 2 mM TEA reduziert den Strom fast auf null. Das legt einen Hetero-Austausch-Mechanismus nahe, bei dem ein organisches Kation gegen das andere ausgetauscht wird.



**Abb. 3.2-15 Ströme bei Anwesenheit von Cholin auf der extrazellulären oder auf beiden Membranseiten. A:** Die Pipette wurde mit 20 mM Cholin vorbeladen und das Bad mit 2 oder 20 mM Cholin, 2 mM TEA, 100 μM Chinin oder ohne Substrat perfundiert (durch Balken oder das Fehlen von Balken gekennzeichnet). Spannungspulse wurden nach kompletten Lösungswechseln zu den mit Kleinbuchstaben bezeichneten Zeitpunkten an die Patchmembran angelegt (siehe auch Abb. 3.2-17A). Unter symmetrischen Bedingungen, das heißt mit 20 mM Cholin in Pipette und Bad (siehe (a) und (g)) wurde ein Nettostrom von null beobachtet (gestrichelte Linie). Die völlige Wegnahme von Substrat aus dem Bad führte zu einwärts gerichteten Strömen (b) und (e). Man kann von (b) nach (e) eine Signalabnahme des Einwärtsstromes (*rundown*) beobachten. Die Perfusion mit 2 mM Cholin (f) führt zu einem reduzierten Einwärtsstrom. Die Zuführung von 100 μM Chinin (c) oder 2 M TEA (h) hemmt den Einwärtsstrom fast vollständig. **B:** Experiment analog zu **A** mit 2 mM Cholin in der Pipette. Das Bad wurde mit 1; 2; 5 oder 20 mM Cholin, 100 μM Chinin oder keinem Substrat perfundiert. Die unterhalb und oberhalb der gestrichelten Linie beobachtbaren Ströme können als durch rOCT2 vermittelte Einwärts- und Auswärtsströme interpretiert werden. Kleinbuchstaben kennzeichnen das Anlegen von Spannungspulsen an die Patchmembran (siehe Abb. 3.2-17B).

### 3.2.3.2.2 Vorbeladung der Pipette mit TMA-Cl

Abb. 3.2–16 zeigt den elektrischen Strom von zwei Patchmessungen in „i/o“-Konfiguration bei 0 mV und Beladung der Patchpipette mit TMA-Cl in fast sättigender (20 mM) oder in halbsättigender Konzentration (3 mM) analog zu den Messungen mit Cholin in der Pipette.



**Abb. 3.2–16 Ströme bei Anwesenheit von TMA auf der extrazellulären oder auf beiden Membranseiten.** Die Experimente wurden wie in Abb. 3.2–15 beschrieben durchgeführt, jedoch mit 20 mM TMA (A) oder 3 mM TMA (B) in der Patchpipette und 1,25 oder 1,5 mM IBMX als Inhibitor. Die Kleinbuchstaben bezeichnen wie in Abb. 3.2–15 das Anlegen von Spannungspulsen (siehe Abb. 3.2–18). **A:** Von (a) nach (b) ist eine Signalabnahme zu beobachten. 1,5 mM IBMX hemmt den durch 20 mM TMA verursachten Einwärtsstrom fast vollständig (e). **B:** Je nach Richtung des TMA-Konzentrationsgradienten können Einwärts- (c), (e), oder Auswärtsströme (f) beobachtet werden.



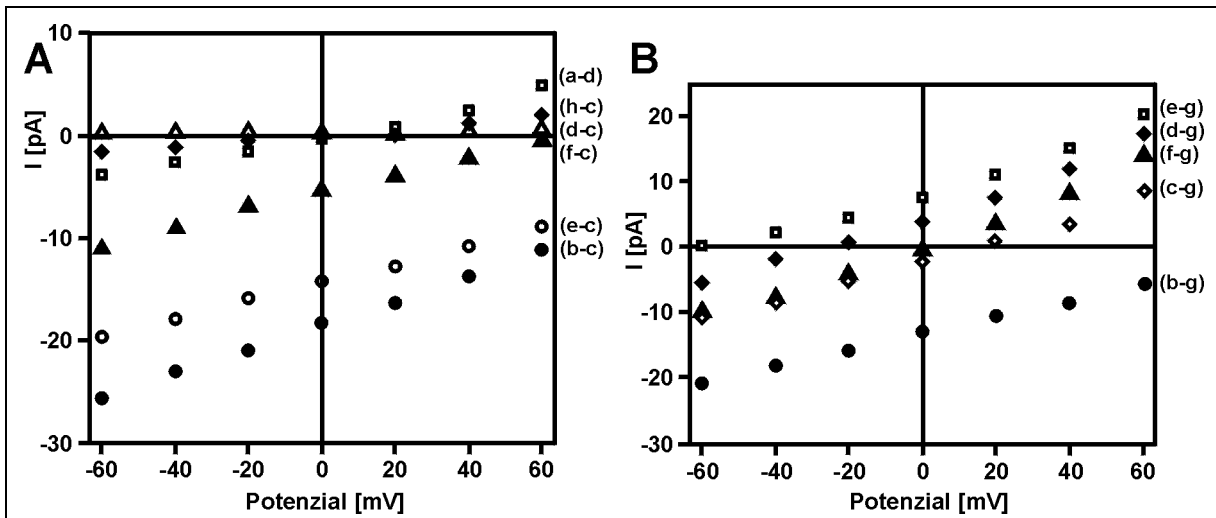
Bei Perfusion des Bades mit substratfreier Lösung misst man einen durch das TMA in der Pipette verursachten elektrischen Einwärtsstrom. Dieser kann durch Applikation von 1,25 mM beziehungsweise 1,5 mM IBMX fast vollständig gehemmt werden (Vergleiche die Ströme in Abb. 3.2–16A zu den Zeitpunkten (d) und (e)). Ebenso kann ein durch TMA im Bad induzierter Ausstrom mit IBMX gehemmt werden (vergleiche die Ströme zu den Zeitpunkten (f) und (g) in Abb. 3.2–16B). In Abb. 3.2–16A kann man von (a) zu (d) den typischen *rundown* des durch TMA induzierten Stromes beobachten. Im Vergleich zu Chinin-gehemmten Strömen erholen sich die IBMX-gehemmten Ströme nach Wegnahme des Inhibitors mit  $\tau = 1\text{--}3\text{ s}$  viel schneller (siehe Abb. 3.2–14). Bei gleichen TMA-Konzentrationen auf beiden Seiten der Patchmembran, also symmetrischen Bedingungen, heben sich wie bei den Messungen mit Cholinchlorid in der Pipette Ein- und Auswärtsströme gegenseitig auf. Zu den mit kleinen Buchstaben bezeichneten Zeiten wurden kurze Spannungspulse zur Ermittlung von Strom-Spannungskennlinien angelegt. In Abb. 3.2–16B führen einwärts- und auswärtsgerichtete Konzentrationsgradienten über die Patchmembran, die durch Perfusion mit 1 mM beziehungsweise 10 mM TMA-Cl entstehen, zu entsprechenden Einwärts- und Auswärtsströmen.

### **3.2.3.3 Spannungsabhängigkeit bei verschiedenen Substrat-Konzentrationsgradienten**

#### **3.2.3.3.1 Spannungsabhängigkeit bei Vorbeladung der Patchpipette mit Cholinchlorid**

Ähnlich wie bei den in den Kapiteln „Spannungsabhängigkeit des Auswärtsstromes“ und „Spannungsabhängigkeit des Einwärtsstromes bei Messungen in „o/o“-Konfiguration beschriebenen Messungen ohne Substrat in der Patchpipette, wurden zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit auch nach Vorbeladung der Pipette mit Cholinchlorid 200 ms lange Spannungspulse zu verschiedenen Membranpotenzialen zwischen  $-60$  und  $+60\text{ mV}$  an die Patchmembran angelegt. Im Gegensatz zu den Messungen ohne Substrat in der Pipette können zur Ermittlung der Strom-Spannungskennlinien keine Differenzen von Strömen in An- und in Abwesenheit von Substrat gebildet werden, weil das Cholinchlorid in der Pipette nicht austauschbar ist. Wie jedoch im Kapitel 3.2.3.1 gezeigt wurde, kann der durch Cholin induzierte Einstrom von der zytoplasmatischen Seite aus fast vollständig trans-inhibiert werden. Strom-Spannungskennlinien werden deshalb aus der Differenz von Strömen in An- und in Abwesenheit von Chinin in sättigender Konzentration ( $100\text{ }\mu\text{M}$ ) gebildet. In Abb. 3.2–15 wurden bei Vorbeladung der Pipette mit 20 mM und 2 mM Cholin Spannungspulse zu den

mit kleinen Buchstaben bezeichneten Zeiten angelegt. Die resultierenden Strom-Spannungskennlinien sind in Abb. 3.2–17 dargestellt. Alle Kennlinien sind im untersuchten Spannungsbereich praktisch linear, ihre Steigungen jedoch unterschiedlich. Die Differenz (weiße Dreiecke (*d-c*)) in Abb. 3.2–17A der jeweils mit 100  $\mu\text{M}$  Chinin gehemmten Ströme mit 20 mM Cholinchlorid und ohne Cholinchlorid im Bad ist für alle untersuchten Spannungen fast null, die praktisch vollständige Trans-Inhibierung der durch Cholin induzierten elektrischen Ströme mit 100  $\mu\text{M}$  Chinin ist also im gesamten untersuchten Spannungsbereich gewährleistet.



**Abb. 3.2–17 I/U-Kennlinien für das Experiment aus Abb. 3.2–15.** Spannungspulse wurden zu den in Abb. 3.2–15 mit Kleinbuchstaben bezeichneten Zeiten an die Patchmembran angelegt und Differenzströme gegen Ströme in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  Chinin genommen. Daraus resultierende I/U-Kennlinien wurden gegen das Membranpotenzial aufgetragen. Die in **A** mit Quadraten gekennzeichneten Differenzströme (a–d) sind durch Subtraktion der aus den Spannungspulsen zum Zeitpunkt (d) resultierenden Ströme (20 mM Cholin und 100  $\mu\text{M}$  Chinin im Bad) von den korrespondierenden Strömen zum Zeitpunkt (a) (20 mM Cholin im Bad) entstanden, alle anderen Kennlinien wurden in ähnlicher Weise erhalten. Zur Bestimmung spezifischer Leitfähigkeiten wurden Regressionsgeraden durch die Daten einzelner I/U-Kennlinien gelegt. **A:** I/U-Kennlinien für das Experiment in Abb. 3.2–15A. Die in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  Chinin aufgenommen Ströme wurden durch die zusätzliche Zugabe von 20 mM Cholin nicht verändert (offene Dreiecke (*d-c*)). Die Signalabnahme in Abb. 3.2–15A (b) zu (e) ist auch anhand der I/U-Kennlinien zu sehen (volle und offene Kreise). **B:** I/U-Kennlinien für das Experiment in Abb. 3.2–15B. Sämtliche Differenzen wurden gegen die Ströme zum Zeitpunkt (g) in Abb. 3.2–15B (2 mM Cholin und 100  $\mu\text{M}$  Chinin im Bad) genommen. Bei endlichen Cholin-konzentrationsgradienten schneiden die I/U-Kennlinien die null Nettostrom markierende gestrichelte Linie.

(i) *Strom-Spannungskennlinien bei „unendlichem“ Cholin-Einwärtsgradienten*

Bei Perfusion des Bades mit cholinfreier Lösung (siehe Abb. 3.2–15A (b) und (e) sowie Abb. 3.2–15B (b)), also bei einem „unendlichen“ einwärtsgerichteten Cholinkonzentrationsgradienten, misst man einen Einwärtsstrom. Diese Messkonfiguration entspricht den Messungen in „o/o“-Konfiguration (siehe Kapitel 3.2.2.1). Die Strom-Spannungskennlinien für einen „unendlichen“ einwärtsgerichteten Cholinkonzentrationsgradienten (siehe Abb. 3.2–17A schwarze Kreise (b-c) und weiße Kreise (e-c) sowie Abb. 3.2–17B schwarze Kreise (b-g)) gleichen wie erwartet den in „o/o“-Konfiguration gemessenen Kennlinien (siehe Abb. 3.2–12A).

Die Strom-Spannungskennlinie für TEA im Bad (Abb. 3.2–17A schwarze Rauten (h-c)) ähnelt der Kennlinie für eine Hemmung mit 100  $\mu$ M Chinin (weiße Dreiecke (d-c)). Dies bedeutet nicht unbedingt, dass zytoplasmatisch zugeführtes TEA den durch Cholin induzierten Einwärtsstrom (und Cholin in der Pipette den durch TEA induzierten Auswärtsstrom) stark hemmt, da die Zugabe von TEA-Cl allein, ohne Cholinchlorid in der Pipette, im Gegensatz zu Chinin sehr wohl einen Auswärtsstrom induzieren kann (siehe Abb. 3.2–1C). Vielmehr muss man die Möglichkeit eines elektro-neutralen Austausches der organischen Kationen TEA und Cholin in Betracht ziehen, bei dem sich der durch Cholin induzierte Einwärtsstrom und der durch TEA induzierte Auswärtsstrom gegenseitig aufheben. Auf diesen Mechanismus wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

(ii) *Strom-Spannungskennlinien bei endlichen Cholinkonzentrationsgradienten*

Für endliche ein- und auswärtsgerichtete Cholinkonzentrationsgradienten, das heißt bei Anwesenheit von Cholin im Bad, schneiden die Strom-Spannungskennlinien die Abszisse (siehe Abb. 3.2–17). Da unterhalb der Abszisse Einwärts- und oberhalb Auswärtsströme definiert sind, markiert der Schnittpunkt das Umkehrpotenzial des durch Cholin induzierten elektrischen Stromes. Der einwärtsgerichtete Cholinkonzentrationsgradient von 20 : 2 bei Vorbeladung der Patchpipette mit 20 mM Cholinchlorid und Perfusion des Bades mit 2 mM Cholinchlorid (siehe (f) in Abb. 3.2–15A) führt zum Beispiel zu einem Umkehrpotenzial von +65 mV (Abb. 3.2–17A schwarze Dreiecke (f-c)), der auswärtsgerichtete Gradient von 2 : 20 (Pipette: 2 mM und Bad: 20 mM Cholinchlorid, siehe (e) in Abb. 3.2–15B) zu einem von –60 mV (Abb. 3.2–17B weiße Quadrate (e-g)) und gleiche Cholinkonzentrationen auf beiden Seiten (20 mM Cholinchlorid in Abb. 3.2–15A (a) und 2 mM in Abb. 3.2–15B (f)) führen zu einem Umkehrpotenzial von 0 mV (Abb. 3.2–17A Quadrate (a-d) und Abb. 3.2–17B Dreiecke (f-g)). In Tabelle V sind die aus Abb. 3.2–17 grafisch bestimmten Umkehrpotenziale

in der mittleren Spalte aufgetragen. Diese Werte stimmen mit den mit Hilfe der Nernstgleichung (Gleichung (1)) und der entsprechenden Cholin Konzentrationsgradienten aus den extrazellulären und intrazellulären Cholin Konzentrationen  $[CH]_o$  und  $[CH]_i$  errechneten Nernstpotenzialen  $U_{CH}$  (dritte Spalte in Tabelle V) wie erwartet überein, wenn man in Gleichung (1) den Ausdruck  $R \cdot T \cdot (z \cdot F)^{-1} = 26 \text{ mV}$  für  $z = +1$  bei  $25^\circ\text{C}$  einsetzt.

**Tabelle V. Umkehrpotenziale für cholininduzierte Ströme**

Cholingradient <sup>a</sup>	Umkehrpotenzial <sup>b</sup> [mV]	Nernstpotenzial <sup>c</sup> [mV]
20 : 20	0	0
20 : 2	65	60
2 : 20	-60	-60
2 : 5	-25	-24
2 : 2	0	0
2 : 1	15	18

<sup>a</sup> Pipettenkonzentration [mM] : Badkonzentration [mM]; <sup>b</sup> aus Abb. 3.2-17 entnommen; <sup>c</sup> berechnet für Standardbedingungen ( $25^\circ\text{C}$ )

*(iii) Leitfähigkeiten bei symmetrischer Cholin Konzentration und bei „unendlichem“ Cholin-Einwärtsgradienten*

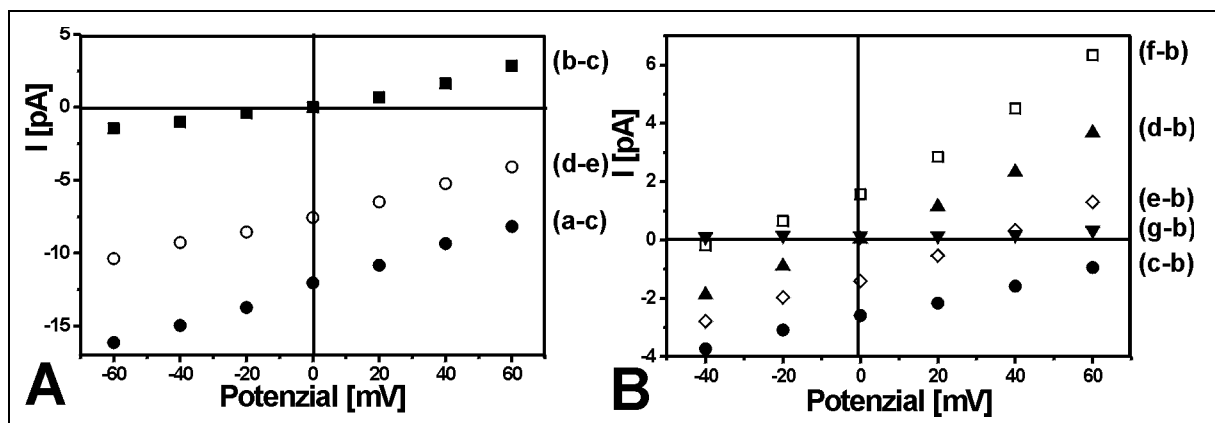
Die Bestimmung von Leitfähigkeiten aus den Steigungen der Strom-Spannungskennlinien mittels linearer Regression führt zu einer interessanten Beobachtung. Unter sättigenden symmetrischen Bedingungen mit 20 mM Cholinchlorid auf beiden Seiten der Patchmembran (Abb. 3.2–17A Quadrate (a-d)) ist die spezifische Leitfähigkeit der Strom-Spannungskennlinien mit  $\sim 75 \text{ pS}$  niedriger als die Leitfähigkeit von  $\sim 110 \text{ pS}$  bei einem „unendlichen“ Cholin-Einwärtsgradienten mit 20 mM Cholinchlorid auf der extrazellulären und keinem Cholin auf der zytoplasmatischen Seite (Abb. 3.2–17A schwarze Kreise (b-c)). Für 20 mM Cholin auf der extrazellulären und 2 mM TEA auf der zytoplasmatischen Seite der Patchmembran (Abb. 3.2–17A Rauten (h-c)) ist die spezifische Leitfähigkeit mit  $\sim 30 \text{ pS}$  sogar noch niedriger.

Hingegen ist unter halbsättigenden symmetrischen Bedingungen mit 2 mM Cholin auf beiden Seiten der Patchmembran (siehe Abb. 3.2–17B Dreiecke (f-g)) die spezifische Leitfähigkeit mit  $\sim 200 \text{ pS}$   $\sim 50 \%$  höher als die entsprechende Leitfähigkeit für 2 mM Cholinchlorid auf der extrazellulären und keinem Cholin auf der zytoplasmatischen Seite mit  $\sim 130 \text{ pS}$  (siehe Abb.

3.2–17B Kreise (b-g)). Dieses Ergebnis hat wichtige Konsequenzen für den Mechanismus des durch rOCT2 vermittelten Transports und wird später ausführlich diskutiert werden.<sup>5</sup>

### 3.2.3.3.2 Spannungsabhängigkeit bei Vorbeladung der Patchpipette mit TMA-Cl

Analog zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit des durch Cholin induzierten Stromes bei Vorbeladung der Patchpipette mit Cholinchlorid wurden auch bei den Messungen des durch TMA induzierten Stromes mit TMA-Cl in der Pipette Spannungspulse an die Patchmembran angelegt. Für die Messungen aus Abb. 3.2–16 bei Vorbeladung mit 20 mM und 3 mM TMA sind in Abb. 3.2–18 die durch Differenzbildung zu IBMX-gehemmten Strömen gewonnenen Strom-Spannungskennlinien gezeigt. Durch Differenzbildung gegen IBMX oder gegen Chinin erhaltene Strom-Spannungskennlinien sind praktisch nicht zu unterscheiden; im direkten Vergleich hemmen 1,5 mM IBMX und 100  $\mu$ M Chinin den durch TMA induzierten Strom genauso gut. Die Differenzkurve (g-b) in Abb. 3.2–18B ist fast null und zeigt damit, dass 1,25 mM IBMX auch den durch TMA induzierten Einwärtsstrom bei



**Abb. 3.2–18 I/U-Kennlinien für das Experiment aus Abb. 3.2–16.** I/U-Kennlinien für 20 mM TMA (A) oder 3 mM TMA (B) in der Patchpipette wurden analog Abb. 3.2–17 aus Differenzströmen zu den in Abb. 3.2–16 mit Kleinbuchstaben bezeichneten Zeiten hergestellt. **A:** I/U-Kennlinien für das Experiment in Abb. 3.2–16A. Differenzen zu Strömen in Anwesenheit von 1,5 mM IBMX waren in Anwesenheit von 20 mM TMA (gefüllte Quadrate (b-c)) oder in Abwesenheit von TMA (offene Quadrate (f-e)) im Bad nicht wesentlich unterschiedlich. Die Signalabnahme in Abb. 3.2–16A (b) zu (e) ist auch anhand der I/U-Kennlinien zu sehen (volle und offene Kreise). **B:** I/U-Kennlinien für das Experiment in Abb. 3.2–16B. Sämtliche Differenzen wurden gegen die Ströme zum Zeitpunkt (b) in Abb. 3.2–16B (3 mM TMA und 1,5 mM IBMX im Bad) genommen. Bei endlichen TMA-Konzentrationsgradienten schneiden die I/U-Kennlinien die null Nettostrom markierende gestrichelte Linie. Die I/U-Kennlinie (g-b) ist fast null und deutet damit auf eine fast vollständige Trans-Inhibierung durch TMA induzierter Einwärtsströme durch IBMX hin. Die I/U-Kennlinie (h-b) ist ebenso fast null und zeigt damit, dass sich die Leitfähigkeit des Membranpatches während der Messung nicht wesentlich geändert hat.

<sup>5</sup> Das Vergleichen von Leitfähigkeiten aus unterschiedlichen Patches ist zwar nicht direkt möglich. Hier jedoch wurden wohlgermerkt lediglich die Verhältnisse von Leitfähigkeiten einer Messung (unter sättigenden Bedingungen) mit denen von einer anderen Messung (unter halbsättigenden Bedingungen) verglichen.

allen untersuchten Spannungen fast vollständig trans-inhibiert.

Die Strom-Spannungskennlinien für TMA ähneln in ihrer Form den Kennlinien für Cholin. Die Umkehrpotenziale für den durch TMA induzierten Strom und die entsprechenden Nernstpotenziale sind in Tabelle VI aufgeführt und stimmen gut miteinander überein. Für 3 mM TMA extrazellulär und kein TMA intrazellulär in Abb. 3.2–18B ist die spezifische Leitfähigkeit mit ~30 pS geringer als für 3 mM TMA auf beiden Seiten der Membran mit ~55 pS. Dagegen ist die Leitfähigkeit für 20 mM TMA extrazellulär und kein TMA intrazellulär mit ~70 pS (Abb. 3.2–18A (*a-c*)) beziehungsweise ~50 pS (*d-e*) höher als ~35 pS für 20 mM TMA auf beiden Seiten der Membran (*b-c*). Es sei nochmals angemerkt, dass hierbei wie auch im vorigen Kapitel keine Leitfähigkeiten aus unterschiedlichen Messungen direkt verglichen werden.

**Tabelle VI. Umkehrpotenziale für TMA-induzierte Ströme**

Cholingradient <sup>a</sup>	Umkehrpotenzial <sup>b</sup> [mV]	Nernstpotenzial <sup>c</sup> [mV]
20 : 20	0	0
3 : 10	-35	-31
3 : 3	0	0
3 : 1	30	29

<sup>a</sup> Pipettenkonzentration [mM] : Badkonzentration [mM]; <sup>b</sup> aus Abb. 3.2-18 entnommen; <sup>c</sup> berechnet für Standardbedingungen (25 °C)

### **3.3 Amperometrische Messungen an spannungsgeklammten Oozyten**

Für eine nähere Untersuchung des Austauschs von organischen Kationen durch rOCT2 sind rein elektrische Messmethoden wie die Spannungsklemme an ganzen Zellen oder die Giant Patch Methode ungeeignet, weil mit ihnen nur der insgesamt fließende elektrische Strom über die Zellmembran aufgezeichnet werden kann. Sich überlagernde Ein- und Auswärtsströme können nicht separiert werden, und es lässt sich nicht entscheiden, welchen Beitrag einzelne Ionensorten zu dem Gesamtstrom liefern.

Um diese Informationen zugänglich zu machen, kann man die elektrischen Methoden um eine ionenselektive Methode erweitern. Eine gängige Methode ist die Verwendung radioaktiv markierter Substanzen, die aber bei gleichzeitiger Ableitung elektrischer Signale sehr hohe Anforderungen an den experimentellen Aufbau stellt. Bei der Untersuchung organischer Kationen Transporter bietet die Amperometrie eine elegante Alternative. Hierbei wird ein leicht oxidierbares Substrat des Transporters, wie zum Beispiel Dopamin, an einer Carbonfaser-Elektrode oxidiert und mit Hilfe des fließenden Redox-Stroms nachgewiesen. Dieser Nachweis ist bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen hoch selektiv.

Durch Inkubation in einer dopaminhaltigen Lösung können rOCT2 exprimierende Oozyten mit Dopamin vorbeladen werden. Anschließend kann der Ausstrom von Dopamin aus den Zellen mit Hilfe der Carbonfaser-Elektrode nachgewiesen werden. Hierzu wird die Carbonfaser-Elektrode direkt auf die Zellmembran aufgesetzt. Gleichzeitig kann die Zelle auf ein definiertes Haltepotenzial geklemmt und der elektrisch fließende Strom aufgezeichnet werden. Für die folgenden Messungen wurde ein Teil der rOCT2 exprimierenden Oozyten und der nicht injizierten Kontroll-Oozyten für 2 bis 30 Stunden in ORi + 10 mM Dopamin eingelegt. Eingelegte Oozyten wurden unmittelbar vor der Messung zweimal mit ORi gewaschen.

#### **3.3.1 Amperometrischer Nachweis des durch rOCT2 vermittelten Dopamintransports**

##### **3.3.1.1 Untersuchung von unspezifischen Redox-Strömen**

Um nachzuweisen, dass der an der Carbonfaser-Elektrode gemessener Redox-Strom praktisch ausschließlich durch einen durch rOCT2 induzierten Ausstrom von Dopamin verursacht wird,

können folgende Kontrollexperimente durchgeführt werden. Mit Experimenten an in Dopamin eingelegten, nicht injizierten Kontroll-Oozyten kann gezeigt werden, dass die unspezifische Aufnahme und Abgabe von Dopamin vernachlässigbar ist und zu keinen Redox-Strömen an der Carbonfaser-Elektrode führt. Experimente an nicht eingelegten, rOCT2 exprimierenden Oozyten zeigen, dass ein möglicher Ausstrom von leicht oxidierbaren endogenen Substraten von rOCT2 ebenfalls vernachlässigbar ist.

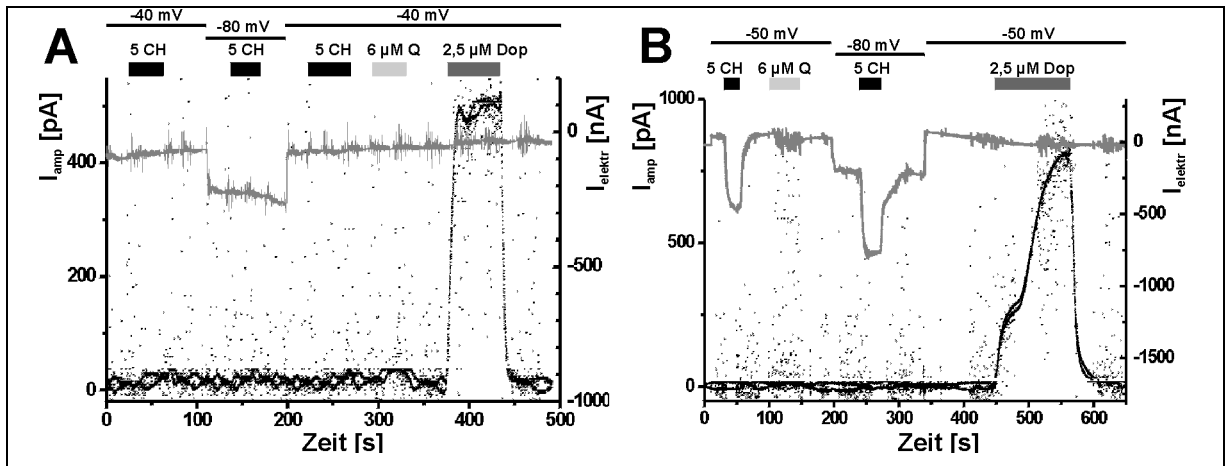
#### *Unspezifische Dopaminabgabe von Oozyten*

Die Messung von nicht injizierten Kontroll-Oozyten, die für 24 Stunden in 10 mM Dopamin eingelegt worden waren, zeigte nach Abwaschen der dopaminhaltigen Lösung keinen Unterschied zur Messung ohne Oozyte (siehe Abb. 3.3–1A). Der Redox-Strom blieb vor und nach dem Klemmen der Kontroll-Oozyte auf unterschiedliche Haltepotenziale unverändert bei 0 bis 10 pA, ebenso bei der Perfusion mit Cholin und Chinin. Von der Kontroll-Oozyte möglicherweise unspezifisch aufgenommenes Dopamin konnte nicht an der Carbonfaser-Elektrode nachgewiesen werden. Der elektrische Strom folgte, bedingt durch die endogene Leitfähigkeit der Oozyte, dem Wechsel des Haltepotenzials und reagierte nicht auf die Substratwechsel.

#### *Durch rOCT2 vermittelter Ausstrom endogener oxidierbarer Substanzen*

rOCT2 exprimierende Oozyten, die nicht in Dopamin eingelegt worden waren, zeigten mit einem Redox-Strom von 0 bis 10 pA keinen Unterschied zu in Dopamin eingelegten Kontroll-Oozyten oder zu Messungen ohne Oozyte. In Abb. 3.3–1B ist anhand der elektrischen Stromspur erkennbar, dass die Oozyte Cholin hinein- und endogene Substrate heraustransportieren kann. Letzteres ist indirekt durch die (geringe) Inhibierung dieses Transports durch Chinin zu sehen (Nagel *et al.* 1997). Die Carbonfaser-Elektrode zeigt jedoch bei allen Lösungs- und Potenzialwechseln unverändert einen Redox-Strom um die 0 pA an und reagiert nur auf die direkte Applikation von 2,5  $\mu$ M Dopamin. Es war an der Carbonfaser-Elektrode weder bei Kontroll-Zellen noch bei rOCT2 exprimierenden Oozyten ein Ausstrom endogen vorhandener, leicht oxidierbarer Substanzen nachweisbar.





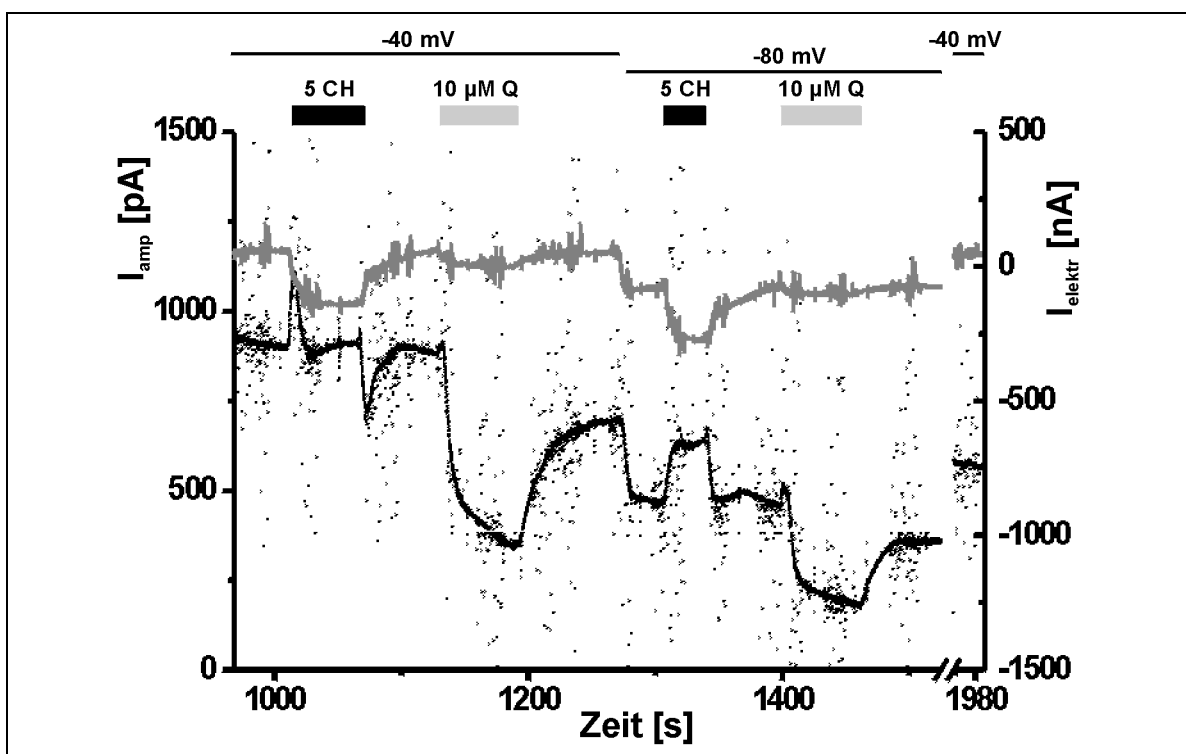
**Abb. 3.3–1 Redox-Strom und elektrischer Strom bei Kontrollmessungen.** **A:** Redox-Strom und elektrischer Strom einer Kontroll-Oozyte. Eine nicht-injizierte Oozyte wurde für 24 Stunden in ORI + 10 mM Dopamin eingelegt. Der Redox-Strom wurde bei Perfusion mit ORI in Abwesenheit der Oozyte auf null geregelt. Die Zelle wurde gewaschen, anschließend bei  $-40$  mV und  $-80$  mV geklemmt und mit 5 mM Cholin (5 CH), 6  $\mu$ M Chinin (6  $\mu$ M Q) und 2,5  $\mu$ M Dopamin (2,5  $\mu$ M Dop) perfundiert. Der elektrische Klemm-Strom (schwarz) und der amperometrische Redox-Strom (grau) wurden aufgezeichnet. Der in Anwesenheit der Zelle in ORI gemessene Redox-Strom liegt etwa bei 10-20 pA. Mit der Potenzialänderung von  $-40$  auf  $-80$  mV ändert sich auch der Klemm-Strom, nicht aber der Redox-Strom. Cholin und Chinin induzieren Redox-Ströme in der Größenordnung der ohne Zelle gemessenen Hintergrundströme und keine messbaren elektrischen Ströme. Dopamin induziert einen Redox-Strom von 500 pA und keinen messbaren elektrischen Strom. Das doppelte Erscheinen der Grundlinie des Redox-Stroms ist auf Bitrauschen durch die Digitalisierung zurückzuführen. **B:** Redox-Strom und elektrischer Strom einer mit 25 ng RNA injizierten, nicht in Dopamin inkubierten Oozyte. Der Redox-Strom wurde bei Perfusion mit ORI in Abwesenheit der Oozyte auf null geregelt. Die Zelle wurde bei  $-40$  mV und  $-80$  mV geklemmt und mit 5 mM Cholin (5 CH), 6  $\mu$ M Chinin (6  $\mu$ M Q) und 2,5  $\mu$ M Dopamin (2,5  $\mu$ M Dop) perfundiert. Der elektrische Klemm-Strom (schwarz) und der amperometrische Redox-Strom (grau) wurden aufgezeichnet. Der in Anwesenheit der Zelle in ORI gemessene Redox-Strom liegt etwa bei 0 pA. Mit der Potenzialänderung von  $-40$  auf  $-80$  mV ändert sich auch der Klemm-Strom, nicht aber der Redox-Strom. Cholin induziert einen hohen und Chinin einen geringen negativen elektrischen Strom. Dopamin induziert einen Redox-Strom von 800 pA und keinen messbaren elektrischen Strom. Das doppelte Erscheinen der Grundlinie des Redox-Stroms ist auf Bitrauschen durch die Digitalisierung zurückzuführen.

### 3.3.1.2 Redox-Ströme von rOCT2 exprimierenden Oozyten nach Vorinkubation in Dopamin

In Dopamin eingelegte, rOCT2 exprimierende Oozyten zeigten nach dem Abwaschen der dopaminhaltigen Lösung bei  $-40$  mV Haltepotenzial einen Redox-Strom an der Carbonfaser-Elektrode von typischerweise über 1000 pA, der von einem durch rOCT2 vermittelten Auswärtstransport von Dopamin verursacht wurde. Eine Eichung der Carbonfaser-Elektrode zeigt, dass dieser Strom einer lokalen Dopaminkonzentration von einigen Mikromolar entspricht. Eine Halbierung des Stromsignals in 10 bis 30 Minuten war vor allem durch die allmähliche Entleerung der Oozyten von Dopamin, aber auch durch die Desensitivierung der Carbonfaser-Elektrode bedingt. Der Wechsel des Haltepotenzials zu einem stärker negativen Wert, in Abb. 3.3–2 beispielsweise von  $-40$  mV auf  $-80$  mV, verringerte den Redox-Strom, eine Potenzialerhöhung erhöhte ihn. Die Zugabe von 10  $\mu$ M Chinin zum Bad reduzierte den

Redox-Strom bei beiden Potenzialen um etwa die Hälfte. Bei Perfusion mit 5 mM Cholin waren bei -40 mV transiente Redox-Ströme und bei -80 mV eine deutliche Zunahme des stationären Redox-Stroms zu beobachten.

Zusammenfassend konnte mit dieser Messung gezeigt werden, dass rOCT2 exprimierende Oozyten bei Inkubation in Dopamin dieses aufnehmen und bei Perfusion mit ORi über einen längeren Zeitraum hinweg wieder abgeben können. Der Dopamintransport ist spannungsabhängig und kann mit Chinin inhibiert werden. Der Effekt von Cholin auf den Dopamintransport in Abhängigkeit des Membranpotenzials ist relativ komplex und soll deshalb im folgenden Kapitel genauer beschrieben werden.



**Abb. 3.3–2 Redox-Strom und elektrischer Strom einer mit 25 ng RNA injizierten, 30 Stunden in 10 mM Dopamin inkubierten Oozyte.** Der Redox-Strom der Carbonfaser wurde bei Perfusion mit ORi in Abwesenheit der Oozyte auf null geregelt. Der elektrische Klemm-Strom (schwarz) und der amperometrische Redox-Strom (grau) wurden aufgezeichnet. Die Oozyte zeigt bei -40 mV Haltepotenzial einen amperometrischen Strom von ~900 pA, der nach 15 Minuten auf ~600 pA abgeklungen ist, also einen stetigen Ausstrom von Dopamin. Die Hyperpolarisation auf -80 mV führt zu einem negativeren elektrischen Strom und einem verminderten amperometrischen Strom. Die Zugabe von 10 μM Chinin (Q) vermindert den Dopaminausstrom bei beiden Potenzialen etwa um die Hälfte und führt zu einem leicht negativeren elektrischen Strom. Die Perfusion mit 5 mM Cholin (CH) lässt bei -40 mV den stationären amperometrischen Strom praktisch unverändert, verursacht aber jeweils beim Lösungswechsel transiente Ströme. Bei -80 mV ist eine Stimulation des Dopaminausstroms durch 10 mM Cholin zu beobachten. Bei beiden Potenzialen verursacht Cholin negative elektrische Ströme.

### 3.3.2 Einfluss von extrazellulär zugeführtem Cholin auf den Dopamintransport

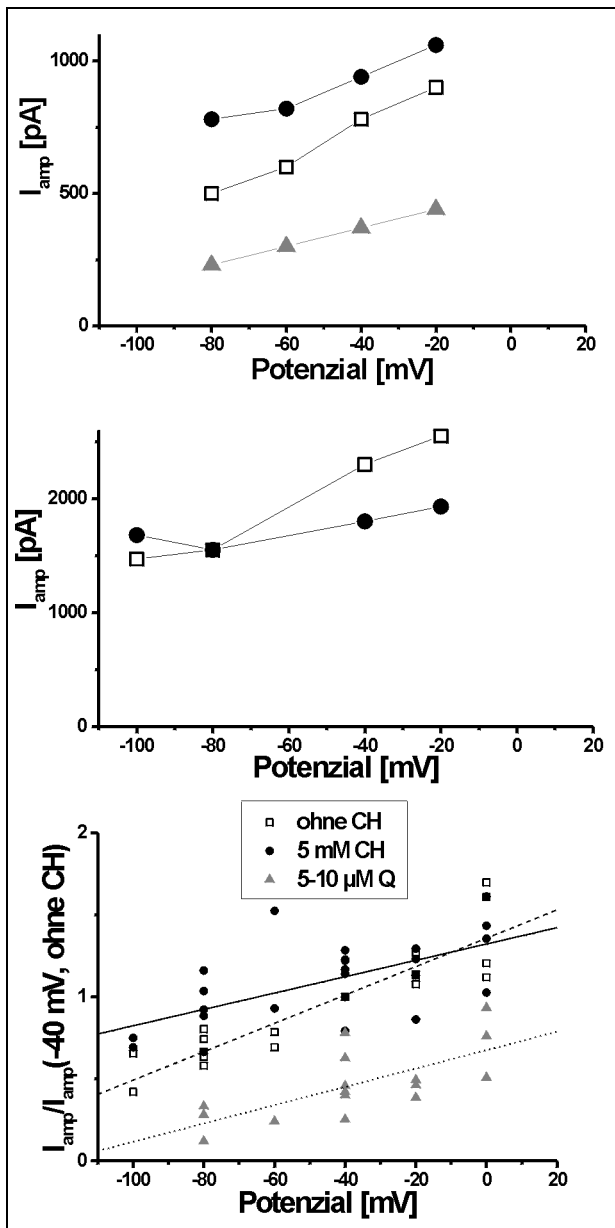
Die Perfusion mit Cholin hat bei rOCT2 exprimierenden Oozyten, die zuvor in Dopamin eingelegt worden waren, großen Einfluss auf den an der Carbonfaser-Elektrode gemessenen Redox-Strom. Da das extrazellulär applizierte Cholin auf den Auswärtstransport des intrazellulär vorliegenden Dopamins einwirkt, kann man dabei von Trans-Effekten sprechen. Eine Zunahme des Redox-Stroms bedeutet eine Transstimulation des Dopaminausstroms durch Cholin, eine Abnahme eine Trans-Inhibierung. Je nach den experimentellen Bedingungen war die Perfusion mit 5 mM Cholin mit keiner Veränderung des Redox-Stroms, einer Zunahme von bis zu 30 % (Transstimulation) oder einer Abnahme von bis zu 30 % (Trans-Inhibierung) verbunden. Welcher Trans-Effekt zu einem gegebenen Zeitpunkt vorlag, war stark vom Haltepotenzial und wahrscheinlich auch von der intrazellulären Dopaminkonzentration abhängig und variierte von Oozyte zu Oozyte. Teilweise traten bei den Lösungswechseln von und zu Cholin transiente Redox-Ströme auf, die größer waren, als der im Kapitel 2.4.4 erläuterte Effekt der Cholinlösung allein auf die Carbonfaser-Elektrode erwarten ließ. Welche Ursache diesem Phänomen zu Grunde liegt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Die transienten Ströme stellten für die hier durchgeführten nicht-zeitabhängigen Messungen jedoch ein geringeres Problem dar, da sie nach wenigen Sekunden bereits abgeklungen waren. Im Folgenden soll die Abhängigkeit des Trans-Effekts vom Haltepotenzial und der intrazellulären Dopaminkonzentration näher charakterisiert werden.

#### 3.3.2.1 Potenzialabhängigkeit der Redox-Ströme

Nach Vorinkubation mit Dopamin wurde der Redox-Strom von rOCT2 exprimierenden Oozyten bei verschiedenen Haltepotenzialen zwischen  $-100\text{ mV}$  und  $0\text{ mV}$  aufgenommen. Der Wechsel zu negativeren Haltepotenzialen führte zu einer Verringerung des Redox-Stroms (siehe Abb. 3.3–2), der Wechsel zu positiveren zu einer Erhöhung. Die Auftragung des Redox-Stroms gegen das Haltepotenzial in Abb. 3.3–3A lieferte fast lineare Redox-Strom-Spannungskennlinien ( $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinien) mit positiver Steigung. Der prozentuale Anteil des durch Chinin inhibierten Redox-Stroms war unabhängig vom Haltepotenzial ( $\sim 50\%$  für  $10\text{ }\mu\text{M}$  Chinin). Deshalb lag die  $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinie für Chinin immer im gleichen Verhältnis unterhalb der Kennlinie für  $\text{ORi}(\text{NaCl})$ .

Bei Perfusion mit 5 mM Cholin konnten von Messung zu Messung unterschiedliche Effekte bezüglich der Spannungsabhängigkeit beobachtet werden. Im einen Extremfall (siehe Abb. 3.3–3A) war der Redox-Strom in Anwesenheit von Cholin ähnlich potenzialabhängig wie in

Abwesenheit und die  $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinie liefen quasi parallel zueinander, das heißt es ergab sich im gesamten untersuchten Spannungsbereich eine Transstimulation des Dopamin-Ausstroms durch extrazellulär zugeführtes Cholin.



**Abb. 3.3–3 A:** Transstimulation des Redox-Stroms einer mit Dopamin vorinkubierten, rOCT2 exprimierenden Oozyte.  $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinien wurden in Anwesenheit von 5 mM Cholin (5 mM CH, Kreise), 10  $\mu$ M Chinin (10  $\mu$ M Q, Dreiecke) oder in ORi ohne Substrat (ohne CH, Quadrate) bestimmt. Alle drei  $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinien besitzen eine positive Steigung. Im gesamten Spannungsbereich zwischen  $-80$  mV und  $-20$  mV ist eine Transstimulation des Redox-Stroms durch 5 mM Cholin und eine Inhibition durch 10  $\mu$ M Chinin erkennbar. **B:** Transstimulation und Trans-Inhibition des Redox-Stroms der mit Dopamin vorinkubierten, rOCT2 exprimierenden Oozyte der Messung aus Abb. 3.3–4A. Die  $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinie weist in Abwesenheit von Cholin eine positive Steigung auf und ist in Anwesenheit von Cholin fast waagrecht. Beide Kennlinien schneiden sich bei etwa  $-80$  mV. **C:** Gemittelte Spannungsabhängigkeit der Transstimulation und Trans-Inhibition des Dopamin-Ausstroms. Sieben Oozyten wurden für mehrere Stunden in 10 mM Dopamin eingelegt und anschließend in An- und Abwesenheit von 5 mM Cholin oder 5–10  $\mu$ M Chinin auf Membranpotenziale von  $-100$  bis  $0$  mV geklemmt. Der Redox-Strom wurde bei jedem Potenzial in Anwesenheit und Abwesenheit des Substrats gemessen und jeweils auf einen kurz zuvor oder danach gemessenen Strom bei  $-40$  mV ohne Substrat normiert.  $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinien wurden durch lineare Regression mit sämtlichen Messwerten für Cholin, Chinin oder ohne Substrat auf der Badseite ermittelt.

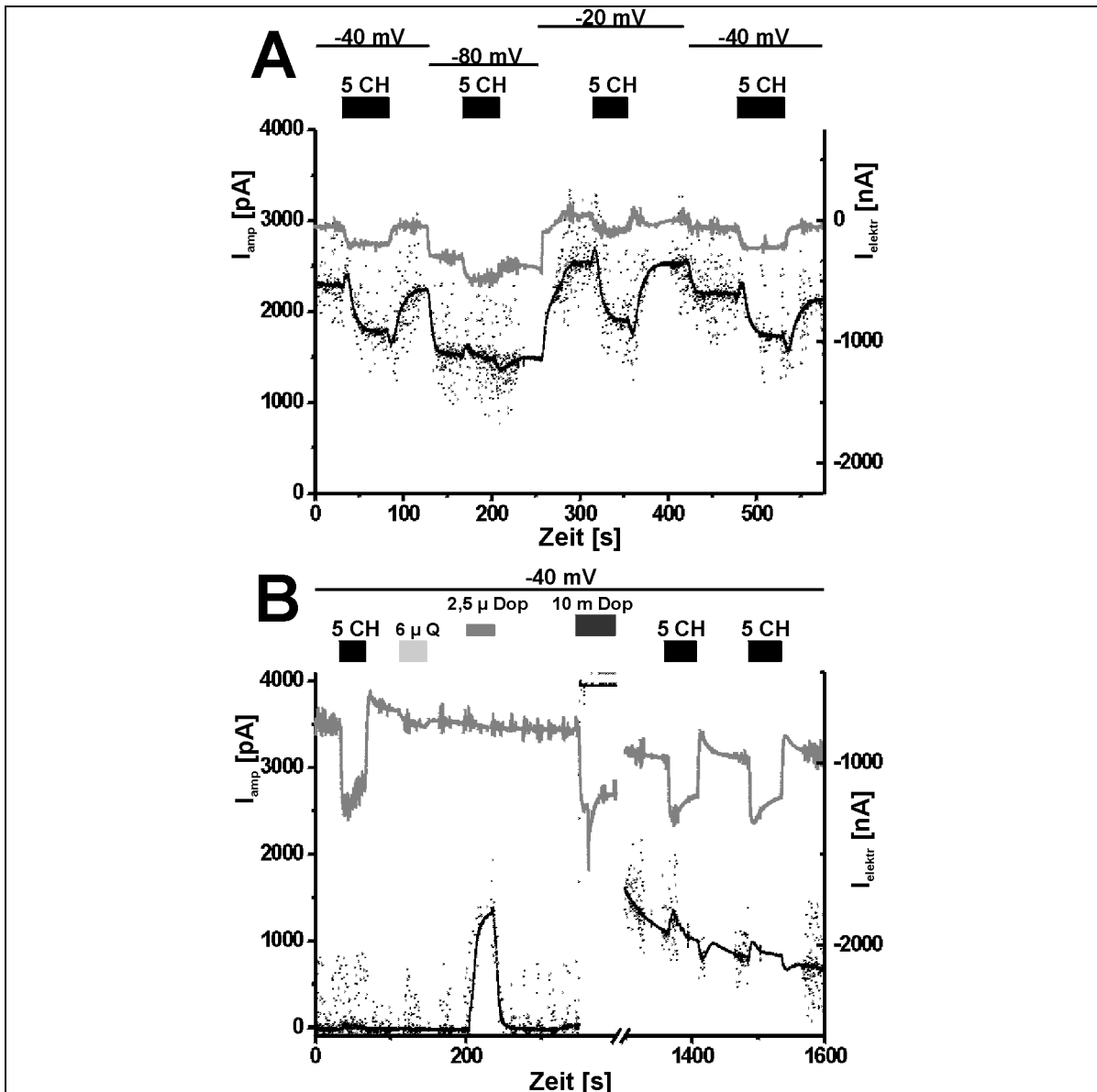
In den meisten Messungen verursachte die Zugabe von Cholin jedoch je nach anliegendem Potenzial eine Transstimulation oder eine Trans-Inhibition. Folgende Tendenzen konnten verzeichnet werden: Bei einem Haltepotenzial von  $+20$  mV war der Redox-Strom in Anwesenheit von Cholin stets geringer als in Abwesenheit, mit zunehmend negativem Haltepotenzial wurde diese Abnahme immer geringer und kehrte sich schließlich in eine Zunahme um (siehe auch Abb. 3.3–4A). Das Umkehrpotenzial für den Trans-Effekt, das heißt das Potenzial, bei dem eine Transstimulation durch Cholin in eine Trans-Inhibition übergeht, war von Oozyte zu Oozyte verschieden und lag meist zwischen  $-20$  bis  $-60$  mV. Da

der Redox-Strom bei Perfusion mit 5 mM Cholin weniger potenzialabhängig war, zeigte die  $I_{\text{Amp}}/U$ -Kennlinie in Anwesenheit von Cholin einen weniger steilen Verlauf und verlief wie in Abb. 3.3–3B mitunter sogar fast waagerecht. Daraus konnte sich sogar ein Schnittpunkt mit der Kennlinie für  $\text{ORi}(\text{NaCl})$  ergeben, der meist zwischen  $-60$  und  $-20$  mV lag. Abb. 3.3–3C zeigt gemittelte Redox-Strom-Spannungskennlinien aus normierten Redox-Strömen von sieben Oozyten in An- und Abwesenheit von Cholin und Chinin. Das mittlere Umkehrpotenzial der normierten Ströme für die Transstimulation durch Cholin liegt im Gegensatz zum mittleren Umkehrpotenzial einzelner Messungen schon bei  $-10$  mV.

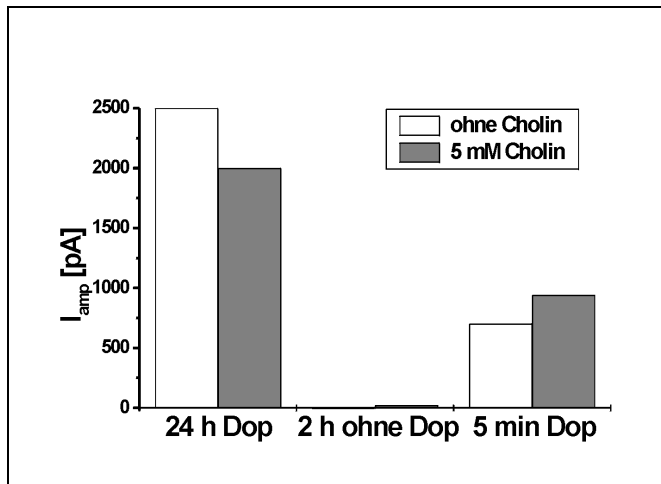
### **3.3.2.2 Abhängigkeit des Trans-Effekts von der intrazellulären Dopaminkonzentration**

Die Stärke des durch Cholin hervorgerufenen Trans-Effekts und sein Umkehrpotenzial waren in hohem Maße von der einzelnen Oozyte abhängig und variierten manchmal sogar während ein und derselben Messung. Bei insgesamt hohen Redox-Strömen war oft im gesamten gemessenen Spannungsbereich eine Trans-Inhibierung und bei geringeren Redox-Strömen schon bei  $-40$  mV eine Transstimulation zu beobachten. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass der Trans-Effekt möglicherweise vom Grad der Vorbeladung der Zelle mit Dopamin abhängig ist. Leider ist es nicht möglich, die intrazelluläre Dopaminkonzentration einer vorinkubierten Oozyte direkt zu bestimmen. Man kann sich aber zu Nutze machen, dass eine Oozyte durch ausreichend lange Inkubation in  $\text{ORi}$  mit oder ohne Dopamin beliebig beladen oder entleert werden kann.

Zur Überprüfung wurde die in Dopamin vorinkubierte Oozyte aus Abb. 3.3–4A nach der Messung für 2 Stunden in  $\text{ORi}(\text{NaCl})$  eingelegt und anschließend wieder vermessen (Abb. 3.3–4B). Es zeigt sich, dass das Dopamin aus der Oozyte zumindest so weit entleert wurde, dass sie bei  $-40$  mV Haltepotenzial keinen messbaren Redox-Strom mehr aufwies. Danach wurde die Zelle direkt in der Messkammer für 15 Minuten wieder mit 10 mM Dopamin inkubiert und zweimal mit  $\text{ORi}(\text{NaCl})$  gewaschen. Die anschließende Messung ergab einen deutlichen Redox-Strom, der jedoch mit etwas über 1000 pA nur etwa halb so hoch war wie vor dem Auswaschen und schneller abfiel. Der vergleichsweise schnelle Abfall deutet darauf hin, dass die Transporter für organische Kationen in der Membran nicht gesättigt sind und die zytoplasmatische Konzentration von Dopamin stetig abnimmt. Bei der Perfusion mit 5 mM Cholin (5 CH) konnte man keine Trans-Inhibierung wie in Abb. 3.3–4A mehr beobachten, sondern sogar eine leichte Transstimulation. In Abb. 3.3–5 wird dies noch einmal verdeutlicht.



**Abb. 3.3–4 Verlauf von Redox-Strom und elektrischem Strom bei Änderung der intrazellulären Dopaminkonzentration.** **A:** Redox-Strom und elektrischer Strom einer für 24 Stunden in 10 mM Dopamin vorinkubierten, rOCT2 exprimierenden Oocyte. Der Redox-Strom wurde in Abwesenheit der Oocyte auf null geregelt. Der elektrische Klemm-Strom (schwarz) und der amperometrische Redox-Strom (grau) wurden aufgezeichnet. Der in Anwesenheit der Zelle in ORi gemessene Redox-Strom lag am Anfang der Messung bei etwa 2300 pA und lag noch nach 9 Minuten bei etwa 2100 pA. Bei Potenzialänderungen änderte sich der Redox-Strom mit dem Klemm-Strom in gleicher Richtung. Cholin induzierte negative elektrische Ströme und Redox-Ströme unterschiedlicher Größe und Richtung mit Transienten bei jedem Lösungswechsel. Bei -20 und -40 mV induzierte Cholin eine ausgeprägte Abnahme und bei -80 mV keine Veränderung des Redox-Stroms. **B:** Verlauf von Redox-Strom und elektrischem Strom (bei -40 mV) der vorinkubierten Oocyte aus **A** nach anschließendem 2-stündigen Auswaschen in ORi und erneutem 15-minütigen Inkubieren in 10 mM Dopamin. Nach dem Auswaschen verhielt sich die Oocyte wie die nichtinkubierte Oocyte in Abb. 3.3–1B. Die Applikation von 10 mM Dopamin führte zu einem hohen negativen elektrischen Strom und einem Redox-Strom an der Sättigungsgrenze des Verstärkers (4  $\mu$ A), der schnell bis auf 300 nA abfiel (Die Skalierung zwischen den senkrechten Strichen wurde für den Redox-Strom geändert). Nach 15-minütiger Inkubation mit 10 mM Dopamin wurde das Bad vier Minuten mit ORi perfundiert. Der Redox-Strom nahm währenddessen auf 1100 pA und nach weiteren 4 Minuten auf 700 pA ab. 5 mM Cholin induzierte keine Änderung oder eine leichte Zunahme des Redox-Stroms.



**Abb. 3.3–5 Trans-Effekte bei  $-40$  mV für die Oozyte aus Abb. 3.3–4.** Nach 24 Stunden Inkubation in 10 mM Dopamin zeigte die Zelle einen hohen Redox-Strom, der durch 5 mM Cholin verringert werden konnte. Nach zwei Stunden Auswaschen in ORi war kein Redox-Strom mehr messbar. Nach erneuter Inkubation für 15 Minuten in 10 mM Dopamin war erneut ein Redox-Strom messbar, der durch 5 mM Cholin erhöht werden konnte. Die elektrischen Ströme in An- und in Abwesenheit von Cholin verhielten sich nach Inkubation, Auswaschung und erneuter Inkubation ähnlich, jedoch nahm die elektrische Leitfähigkeit der Zelle stetig zu.

## 4 Diskussion

### 4.1 Wahl des Expressionssystems für die heterologe Expression von rOCT2

Nach der ersten Klonierung eines Transporters für organische Kationen aus der Rattenniere, rOCT1 (Grundemann *et al.* 1994), wurden weitere homologe Transporter aus verschiedenen Spezies kloniert und teilweise charakterisiert. Als wichtige Vertreter seien rOCT2 (Busch *et al.* 1996; Okuda *et al.* 1996), hOCT1 und 2 (Gorboulev *et al.* 1997) sowie rOCT3 (Kekuda *et al.* 1998) herausgegriffen; eine umfassende Zusammenstellung findet sich zum Beispiel bei (Koepsell *et al.* 1999). Um die biophysikalischen Eigenschaften des Transports von organischen Kationen an einem prominenten Vertreter der OCT-Familie genauer zu untersuchen, wurde der aus der Rattenniere klonierte Transporter rOCT2 ausgewählt, weil mit diesem nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme die höchsten durch Substrat induzierten elektrischen Ströme erzielt werden konnten. Bis jetzt ist jedoch nicht bekannt, ob dieser Umstand eine hohe Transportrate oder eine hohe Expression widerspiegelt. Mittlerweile sind weitere Arbeiten erschienen, die sich mit der Untersuchung von rOCT2 befassen (Urakami *et al.* 1998; Okuda *et al.* 1999; Pan *et al.* 1999; Sweet und Pritchard 1999), jedoch keine unter Verwendung der „patch clamp“-Technik.

#### *Heterologe Expression von rOCT2 in Xenopus-Oozyten*

Das *Xenopus*-Expressionssystem stellte sich als besonders geeignet für elektrophysiologische Untersuchungen an rOCT2 heraus. Die in Kapitel 1.4 beschriebenen Vorteile der *Xenopus*-Oozyten für funktionelle Studien an Membranproteinen wie hohe Translationskapazität, funktionale Expression in der Plasmamembran, einfache Handhabung und gute Eignung für „voltage clamp“- und „patch clamp“-Experimente kamen auch bei der Untersuchung von rOCT2 zur Geltung. So konnten von ganzen, rOCT2 exprimierenden Oozyten in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme bei  $-40\text{ mV}$  in der Regel elektrische Ströme von 100 bis 400 nA abgeleitet werden.

#### *Heterologe Expression von rOCT2 in HEK293-Zellen*

Da sich im Laufe dieser Arbeit herausgestellt hatte, dass die Amplitude der im „giant patch“ erzielbaren Ströme oft der begrenzende Faktor für die Aussagekraft einzelner Messungen war



(siehe Kapitel 4.2.3), wurde zunächst die Eignung anderer Expressionssysteme für die Untersuchung von Transportern für organische Kationen überprüft. Die human-embryonale Nierenzelllinie HEK293 eignet sich gut für elektrophysiologische Messungen mit der „patch clamp“-Technik und ihre Verwendung zur Untersuchung von rOCT2 schien daher naheliegend. Allerdings muss beachtet werden, dass sich bei detaillierten Studien mögliche Interferenzen mit endogenen Transportern für organische Kationen nachteilig auswirken könnten (Zhu *et al.* 1998). Tatsächlich wurden rOCT1, rOCT2 und hOCT2 schon erfolgreich in HEK293-Zellen exprimiert (Nagel *et al.* 1997; Busch *et al.* 1998; Arndt *et al.* 2001). Transient mit rOCT2 transfizierte Zellen zeigten in Flussmessungen mit radioaktiv markiertem Cholin eine spezifische Transportaktivität (Arndt *et al.* 2001). An stabil transfizierten HEK293-Zellen, die mir freundlicherweise von Prof. Dr. Hermann Koepsell für elektrische Messungen zur Verfügung gestellt wurden, konnten in ersten Versuchen jedoch keine cholininduzierten elektrischen Ströme gemessen werden, weshalb dieser Ansatz in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt worden ist. Wahrscheinlich war der Expressionslevel in diesen stabil transfizierten Zellen für elektrische Messungen zu niedrig.

## **4.2 Eignung der „giant patch clamp“-Technik zur Untersuchung von rOCT2**

### **4.2.1 Vorteile und Grenzen der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ganzen Zellen**

Die Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist eine geeignete Methode, um ein elektrogenes Membranprotein wie rOCT2 nach heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten zu untersuchen. Die Methode ist relativ einfach und schnell anzuwenden und man kann Versuche leicht an mehreren Oozyten wiederholen. Ein weiterer Vorteil sind außerdem die ausreichend hohen elektrischen Signale der ganzen Zellen. Bei  $-40$  mV Haltepotenzial konnten durch Zugabe von 5 mM Cholin Einwärtsströme von typischerweise 100 bis 400 nA erzielt werden.

Zu einer weitergehenden Charakterisierung des elektrogenen Transports organischer Kationen durch rOCT2 waren „voltage clamp“-Experimente an ganzen Zellen leider nicht ausreichend. Die mangelnde Kontrollierbarkeit der Versuchsbedingungen machte exakte Aussagen oft schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Gerade die Tatsache, dass an einer ganzen, intakten Zelle gemessen wurde, führte zu einem hochkomplexen Messsystem, bei dem viele Parameter nicht messbar und schon gar nicht kontrollierbar waren. Da nur die extrazelluläre Membranseite für die Applikation von rOCT2-spezifischen Substraten oder Inhibitoren zugänglich war, konnten kinetische Parameter von der zytoplasmatischen Seite aus nicht erfasst werden. Damit fehlten wesentliche Informationen, die für Aussagen über den Transportmechanismus von rOCT2 und damit auch seine physiologische Rolle wichtig sind. Die nicht kontrollierbare Zusammensetzung des Zytoplasmas hatte aber noch eine weitere Konsequenz: Unter Umständen konnten endogen in unbekannten Konzentrationen vorhandene organische Kationen als Substrate oder Inhibitoren von rOCT2 Störungen bei Messungen von der Außenseite verursachen (siehe Nagel *et al.* 1997). Ein weiterer Nachteil der Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme war, dass es teilweise schwierig war, zwischen spezifischen und nicht-spezifischen Effekten in einem Experiment zu unterscheiden, zum Beispiel wenn die Zelle auf eine Potenzialänderung mit dem Öffnen von endogenen Ionenkanälen reagierte. Schließlich ist noch erwähnenswert, dass die Größe der Oozyte bei „voltage clamp“-Messungen sehr langsame Lösungswechsel bedingte, was sich insbesondere beim Auswaschen von Inhibitoren negativ auswirkte (Arndt *et al.* 2001).

#### 4.2.2 Vorteile der „patch clamp“-Methode

Für große Teile dieser Arbeit wurde die „giant patch clamp“-Technik als geeignete Untersuchungsmethode gewählt, weil diese einige entscheidende Vorteile gegenüber „voltage clamp“-Messungen an ganzen Zellen bot. Am Patch konnten die Zusammensetzungen der zytoplasmatischen und extrazellulären Medien kontrolliert und allgemein wohl definierte experimentelle Bedingungen gewährleistet werden. Durch die Zugänglichkeit der zytoplasmatischen Membranseite in „inside out“-Patches konnten kinetische Parameter von der Innenseite gut bestimmt werden. In „outside out“-Patches war die extrazelluläre Seite frei zugänglich, so dass „voltage clamp“-Messungen an ganzen Zellen direkt mit den genauer kontrollierbaren Messungen am Patch verglichen werden konnten. Die Kontrolle von Bad- und Pipettenlösung schaffte wohl definierte Versuchsbedingungen. Damit konnten beispielsweise transportierte Substrate von nicht transportierten Inhibitoren gut unterschieden werden und es traten keine Interferenzen durch unbekannte endogene Substrate auf. Durch Beschränkung der Bad- und Pipettenlösungen auf nicht membrangängige Substanzen konnten unerwünschte Leckleitfähigkeiten des Membranpatches weitgehend vermieden werden. Nicht zuletzt erfolgte der komplette Austausch der Badlösung innerhalb einer Sekunde (siehe Abb. 3.2–14).

#### 4.2.3 Vergleich der erwarteten und der gemessenen Ströme im Membranpatch

Bei Annahme einer relativ homogenen Verteilung von rOCT2 in der Plasmamembran der Oozyte und einer unveränderten Aktivität der Transporter im isolierten Patch kann man über das Flächenverhältnis von Patch zur Membran der gesamten Oozyte die erwarteten Ströme in „patch clamp“-Messungen aus „voltage clamp“-Messungen an ganzen Zellen abschätzen. Die Membranfläche einer Oozyte ist wegen zahlreicher Invaginationen erheblich größer als sich bei der Annahme einer Kugeloberfläche ergeben würde. Sie konnte jedoch über die Messung der Membrankapazität gut bestimmt werden. Mit einer gemessenen Kapazität von typischerweise  $\sim 220 \text{ nF}$  für eine Oozyte mit  $\sim 1 \text{ mm}$  Durchmesser und einer Membrankapazität von  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ergab sich eine Gesamtfläche von  $\sim 2,2 \cdot 10^7 \mu\text{m}^2$  (das ist das Siebenfache einer entsprechenden Kugeloberfläche). Weiterhin konnte man beim Experimentieren direkt beobachten, dass der mit einer Patchpipette herausgerissene Membran Patch nicht eben war, sondern sich in die Pipettenöffnung hineinwölbte. Für die Rechnung wird der Einfachheit halber eine halbkugelschalenförmige Form gewählt. Eine Patchpipette

für *giant patches* mit 24 µm Durchmesser an ihrer Spitze führte demnach zu Patchflächen von  $\sim 900 \mu\text{m}^2$ . Das Flächenverhältnis Patch zu Gesamtmembran war dann  $1 : (2,5 \cdot 10^4)$ . Im gleichen Verhältnis sollten die im Patch erzielbaren zu den an einer ganzen Zelle gemessenen elektrischen Ströme stehen. Ein ähnliches Verhältnis wurde zum Beispiel für in Oozyten exprimiertes Bacteriorhodopsin gefunden (Nagel *et al.* 1995). Die Applikation von 5 mM Cholin führte bei auf  $-40 \text{ mV}$  geklemmten ganzen Zellen zu typischen Einwärtsströmen von 100 bis 400 nA. Damit erwartete man im „o/o“-Patch oder bei Vorbeladung der Pipette mit 5 mM Cholin Einwärtsströme im Bereich von 4 bis 16 pA. In der Regel lagen die tatsächlich gemessenen Ströme im durch obige Abschätzung erwarteten Bereich. Ströme dieser Größenordnung waren für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ausreichend, da Fluktuationen des stationären Membranstromes meist unter 1 pA lagen.

#### **4.2.4 Eignung der „patch clamp“-Technik für zeitaufgelöste Relaxationsexperimente**

Die „patch clamp“-Technik ist im Prinzip für die zeitaufgelöste Untersuchung der Transportkinetik von rOCT2 bestens geeignet (Friedrich und Nagel 1997). Deshalb wurden Vor-Gleichgewichtsmessungen durch Anlegen von sehr kurzen Spannungspulsen zu  $+40 \text{ mV}$  an die Patchmembran und Aufnahme der relaxierenden Ströme nach Tiefpassfilterung mit 2 kHz durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der durch rOCT2 vermittelten zeitaufgelösten Ströme bedingt durch die notwendigerweise hohe Zeitauflösung bei gleichzeitig geringer Signalthöhe zu schlecht war, um gesicherte Aussagen machen zu können, weshalb die Experimente abgebrochen und die Daten in dieser Arbeit nicht präsentiert wurden. Neben einer sorgfältigen Reduktion der Pipettenkapazität und des Hintergrundrauschens müsste für weitere Versuche in dieser Richtung vor allem die Signalthöhe gesteigert werden.

Es gibt noch einen anderen Ansatz, der für zeitaufgelöste Messungen an Membranpatchen erfolgsversprechend sein könnte. Eine sehr schnelle Freisetzung von Substrat könnte man durch Verwendung eines mit einer photolabilen Schutzgruppe (*cage*) geschützten Substrates wie zum Beispiel *caged* Carbachol (Carbamoylcholinchlorid) erzielen. Das geschützte Carbachol selbst sollte nicht von rOCT2 transportiert werden. Mittels eines kurzen Laserpulses könnte dann die Schutzgruppe abgespalten werden und das von rOCT2 transportierbare Carbachol plötzlich freigesetzt werden. Ähnliche Messungen wurden schon

erfolgreich an der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit photolytischer Freisetzung von ATP aus *caged* ATP durchgeführt (Fendler *et al.* 1987; Friedrich *et al.* 1996).

#### 4.2.5 Grenzen der „patch clamp“-Methode

Wie bei allen Methoden hatte die Anwendung der „patch clamp“-Technik auch gewisse Nachteile. Offensichtlich waren der apparative Aufwand sowie die hohen experimentellen Anforderungen. Die Handhabung dieser Methode war schwierig und erforderte sowohl Zeit als auch einiges Geschick, so dass es geboten schien, vor der Durchführung von „patch clamp“-Experimenten erst die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ganzen Zellen auszuschöpfen.

Für bestimmte Experimente von Nachteil war, dass der von rOCT2 vermittelte elektrische Strom nicht nur im Vergleich zu den um Größenordnungen höheren Strömen von klassischen Ionenkanälen gering war, sondern auch im Vergleich zu den Strömen von anderen heterolog exprimierten Membrantransportern wie dem Natrium-Glucose-Kotransporter SGLT1 in Oozyten (Sauer *et al.* 2000) oder dem neuronalen Glutamatransporter EAAC1 in HEK293-Zellen (Grewer *et al.* 2000), obwohl dies aufgrund der in Kapitel 4.2.3 gemachten Abschätzung nicht unerwartet war. Selbst bei Verwendung relativ großer Patchpipettendurchmesser von 20 bis 30  $\mu\text{m}$  (daher die Bezeichnung *giant patch*) betrug der über die Patchmembran fließende elektrische Strom bei Zugabe von 5 mM Cholin und einem Membranpotenzial von 0 mV oft nur 5-10 pA und niemals mehr als 40 pA. Dies galt auch für Einwärtsströme bei Verwendung der „o/o“-Patchkonfiguration und bei Vorbeladung der Patchpipette mit Substrat. Damit war das durch rOCT2 vermittelte Signal mitunter nicht leicht vom Hintergrund zu unterscheiden. Erschwerend kam die stetige Signalabnahme (*rundown*) nach Herauslösung des Patches von der Oozyte hinzu, die zur Folge hatte, dass die elektrischen Ströme schon nach 30 Minuten Messzeit meist zu klein waren, um sinnvolle Ergebnisse zu liefern. Außerdem musste der *rundown* bei der Datenauswertung wieder herausgerechnet werden.

Geringe Ströme in Patchmessungen waren besonders bei der Ermittlung von I/U-Kennlinien problematisch, weil sich dabei gleich vier verschiedene Effekte ungünstig auswirkten: Erstens änderte sich beim Anlegen kurzer Spannungspulse an die Patchmembran bisweilen die Patchmembranleitfähigkeit, entweder allgemein durch Veränderung des Abdichtwiderstandes oder auch speziell durch Aktivierung endogener spannungsaktivierter Ionenkanäle (dem Umkehrpotenzial nach waren es wahrscheinlich Chloridkanäle), zweitens wurden bedingt durch die Elektrogenität des Transporters positive Ströme bei negativen Potenzialen und

negative Ströme bei positiven Potenzialen inhärent kleiner, drittens führte das Anlegen von Spannungspulsen an die Patchmembran an sich schon zu einem erhöhten Rauschen in der Stromantwort und viertens wurden bei der Bildung der Differenzströme zusätzliche Unsicherheiten durch die Subtraktion von zu unterschiedlichen Zeiten aufgenommenen Strömen eingebracht. Beim letzten Punkt musste besonders darauf geachtet werden, dass die Patchmembranleitfähigkeit während der Messung unverändert blieb, der *rundown* des Signals nicht zu groß war und dass bei Verwendung eines Inhibitors die Hemmung des Stromes im ganzen Spannungsbereich gleichmäßig war. Die relativ niedrigen Signale im Patch stellen zwar kein prinzipielles Problem dar, unterstrichen aber die Notwendigkeit, die Dichte an funktionellen Transporterproteinen in der Oozytenmembran zu erhöhen.

Die „patch clamp“-Methode stieß wie auch die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ganzen Zellen an ihre Grenzen, wenn es darum ging, den Beitrag einzelner Ionensorten zum Gesamtstrom zu bestimmen, weil alle elektrischen Teilströme immer nur in ihrer Summe über den Membran Patch aufgenommen werden konnten. Es konnte *a priori* auch nicht unterschieden werden, ob positive Ladung in eine oder negative Ladung in die entgegengesetzte Richtung transportiert wurde. Besonders schwierig wurde es, wenn man einen nichtelektrogenen Transport nachweisen wollte, zum Beispiel den Transport einer ungeladenen Substanz, den Kotransport zweier entgegengesetzt geladener Ionen oder den Austausch zweier gleich geladener Ionen. Für diese Fälle wurde deshalb die Methode der amperometrischen Spannungsklemme entwickelt, mit deren Hilfe der Ausstrom von Dopamin aus rOCT2 exprimierenden Oozyten durch selektive Oxidation an einer Carbonfaser-Elektrode direkt gemessen werden konnte, während gleichzeitig die Aufnahme des elektrischen Transmembranstromes mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme möglich war.

Der Vorteil der Kontrollierbarkeit der intra- und extrazellulären Lösungen bei Messungen am isolierten Membranpatch gegenüber Messungen an ganzen Zellen barg gleichzeitig ein Risiko, weil die das Zytoplasma simulierenden Lösungen (in „i/o“-Konfiguration die Bad- und in „o/o“-Konfiguration die Pipettenlösung) in ihren Zusammensetzungen nicht wirklich dem physiologischen Medium in der Oozyte entsprachen. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Eigenschaften von rOCT2 im isolierten Membranpatch sich von denen in der intakten Zelle unterschieden. Es gibt in der Literatur Anzeichen, dass rOCT2 mittels Phosphorylierung durch wasserlösliche Proteinkinasen reguliert werden kann (Mehrens *et al.* 2000). Ein Hinweis auf Änderungen der Aktivität von rOCT2 im Patch war eine stetige Abnahme des von rOCT2 vermittelten Signals (*rundown*) nach Isolierung des Patches.

Trotz ihrer hier aufgezählten Grenzen ist die „giant patch clamp“-Technik wegen der in Kapitel 1.5.2 genannten Vorteile hervorragend für eine in die Tiefe gehende Charakterisierung von rOCT2 geeignet, wie sie mit anderen Methoden nur schwer zu realisieren wäre.

#### 4.2.6 Ursachen der Signalabnahme im isolierten Membranpatch

Der in Kapitel 3.2.1.2 beschriebene *rundown* des Signals während einer Patchmessung kann verschiedenste Ursachen haben. Die Primärstruktur von rOCT2 lässt auf verschiedene mögliche Phosphorylierungsstellen schließen (Arndt 2000). Im Falle einer Regulation von rOCT2 über den Phosphorylierungsgrad, wie sie zum Beispiel bei dem Chloridkanal CFTR anzutreffen ist (Riordan 1993; Nagel 1999), wäre am isolierten Patch ein Signalverlust durch endogene Phosphatasen oder das Wegspülen von Adenosin-Triphosphat (ATP) denkbar. Allerdings konnte in „voltage clamp“-Experimenten nach Stimulation der Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase) und der Proteinkinase C zur möglichen Erhöhung des Phosphorylierungsgrades von rOCT2 keine Erhöhung des durch den Transporter vermittelten elektrischen Stromes gefunden werden (siehe Kapitel 3.1.1). Die Zugabe des membrangängigen Forskolin zu einer rOCT2 exprimierenden Oozyte, das heißt die Erhöhung des intrazellulären [cAMP]-Spiegels durch Stimulierung der Adenylatcyclase und damit die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase, hatte keinen Effekt auf den durch rOCT2 vermittelten Strom. Eine Modulation der Aktivität von rOCT2 durch Proteinkinase A scheint daher zumindest in Oozyten unwahrscheinlich. Die Zugabe des membrangängigen 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) sollte durch Hemmung der cAMP-abbauenden Phosphodiesterase ebenfalls zu einem erhöhten [cAMP]-Spiegel und damit zur Aktivierung der Proteinkinase A führen. Tatsächlich stellte sich IBMX als Hemmstoff für rOCT2 mit einer apparenten Inhibierungskonstante von ~50-500  $\mu\text{M}$  heraus (siehe Abb. 3.1–1).

Die Stimulation der Proteinkinase C durch Zugabe von Phorbol ester (PMA) hatte sogar zu einer Reduktion des durch rOCT2 vermittelten Stromes geführt (siehe Abb. 3.1–2), was im Gegensatz zu den von Mehrens et al. gefundenen Ergebnissen steht, die allerdings an dem Transporter rOCT1 und in HEK293-Zellen erzielt wurden (Mehrens et al. 2000). Eine Signalabnahme am isolierten Patch durch einen sinkenden Phosphorylierungsgrad von rOCT2 scheint daher unwahrscheinlich und die Ursachen für das Auftreten dieses Phänomens bleiben weiterhin ungeklärt.

### 4.3 Vergleich von zytoplasmatischen und extrazellulären Affinitäten

Elektrische Einwärtsströme konnten mit „voltage clamp“-Messungen an ganzen Zellen, mit „giant patch clamp“-Messungen in „outside out“-Konfiguration oder mit „giant patch clamp“-Messungen in „inside out“-Konfiguration nach Vorbeladung der Patchpipette mit Substrat gemessen werden. Elektrische Auswärtsströme wurden mit „giant patch clamp“-Messungen in „i/o“-Konfiguration gemessen. Die beobachteten Auswärtsströme bei Zugabe von organischen Kationen zur zytoplasmatischen Membranseite waren nicht unerwartet, da schon von Nagel *et al.* auswärts gerichtete Flüsse radioaktiv markierter Substanzen und mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme elektrische Auswärtsströme in rOCT1-exprimierenden Oozyten gezeigt wurden, die am wahrscheinlichsten durch einen durch rOCT1 vermittelten Auswärtstransport erklärbar waren (Nagel *et al.* 1997). Dieses konnte ebenso für rOCT2 bestätigt werden, wie die in Kapitel 3.3 gezeigten Messungen mit der amperometrischen Spannungsklemme an mit Dopamin vorinkubierten Oozyten zeigen. Es war jedoch überraschend, dass sich die apparenten Bindungskonstanten für Cholin und TEA an der zytoplasmatischen Membranseite von denen auf der extrazellulären Seite (an ganzen Zellen) kaum unterschieden (Urakami *et al.* 1998; Sweet und Pritchard 1999; Arndt *et al.* 2001). Auch die Größe typischer elektrischer Ein- und Auswärtsströme im Patch war ungefähr gleich. In Tabelle VII sind zum Vergleich die an isolierten Membranpatchen bei 0 mV Membranpotenzial in „i/o“- und „o/o“-Konfiguration sowie die an ganzen Oozyten in „voltage clamp“- und Flussmessungen gemessenen extrazellulären Affinitäten für Cholin und TEA aufgelistet. Der für TEA gemessene Wert von der zytoplasmatischen Seite im Patch ( $K_{0,5} = 160 \mu\text{M}$  bei 0 mV) stimmte gut mit dem mit extrazellulär aus „voltage clamp“-Messungen bestimmten Wert von  $140\text{--}160 \mu\text{M}$  überein und lag im Bereich der für die extrazelluläre Seite publizierten Werte von  $K_{0,5} = 90 \mu\text{M}$  oder  $\sim 400 \mu\text{M}$  bei Flussmessungen an ganzen Oozyten (Sweet und Pritchard 1999; Arndt *et al.* 2001), der für Cholin ( $K_{0,5} = 2 \text{ mM}$  zytoplasmatisch bei 0 mV) nicht weit daneben (jeweils  $K_{0,5} = 0,7 \text{ mM}$  bei Flussmessungen und bei auf 0 mV geklemmten Oozyten, Arndt *et al.* 2001). Für einen direkten Vergleich der Affinitäten auf beiden Seiten wurden deshalb Messungen in „o/o“-Konfiguration durchgeführt (siehe Abb. 3.2–11). Die extrazellulären Affinitäten bei 0 mV für Cholin ( $K_{0,5} = 2,8 \text{ mM}$ ) und TEA ( $K_{0,5} = 90 \mu\text{M}$ ) unterschieden sich nicht wesentlich von den an der zytoplasmatischen Seite gemessenen Werten und waren auch mit den an ganzen Zellen gefundenen Werten



vergleichbar. Damit konnte gezeigt werden, dass die an isolierten Membranpatches gewonnenen Ergebnisse mit den an ganzen Zellen gewonnenen vergleichbar sind.

Die Symmetrie in den apparenten Affinitäten beiderseits der Plasmamembran ist in guter Übereinstimmung mit der Annahme, dass allein das Membranpotenzial und der chemische Konzentrationsgradient, also das elektrochemische Potential der organischen Kationen, die treibende Kraft für den durch rOCT2 vermittelten Transport darstellen und dieser nur eine geringe Rektifikation zeigt. Stärkere Argumente für diese These werden noch weiter unten in dieser Diskussion gebracht.

**Tabelle VII. Vergleich der Affinitäten an der zytoplasmatischen und der extrazellulären Membranseite**

	zytoplasmatisch („i/o“-Patch) <sup>a</sup>	extrazellulär („o/o“-Patch) <sup>a</sup>	extrazellulär (voltage clamp)	extrazellulär (Flussmessung) <sup>b</sup>
K <sub>0,5</sub> (TEA) [μM]	160 ± 50	90 ± 10	140-160 <sup>c</sup>	90 ± 10 <sup>e</sup> ; ~400 <sup>d</sup>
K <sub>0,5</sub> (Cholin) [mM]	2,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1 <sup>a, e</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>e</sup>

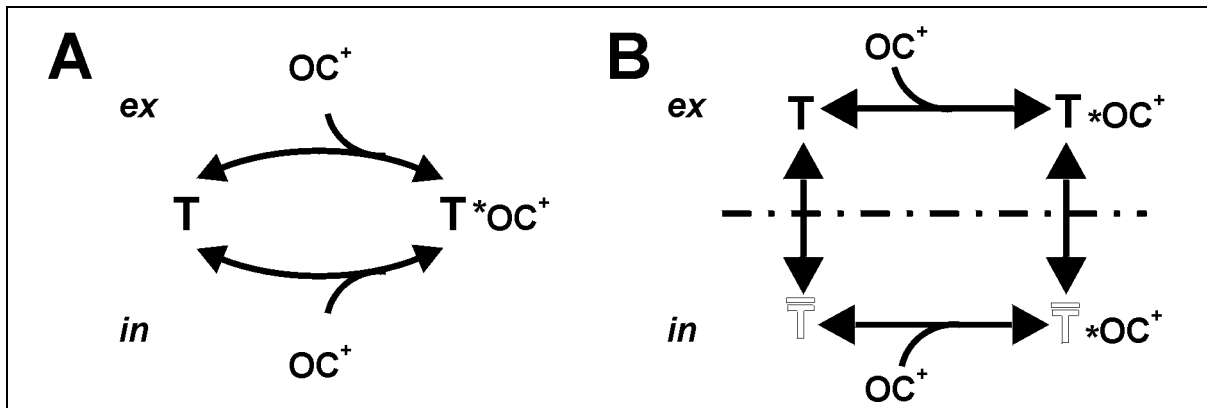
<sup>a</sup> bei 0 mV Membranpotenzial; <sup>b</sup> Potenzial nicht geklemmt; <sup>c</sup> aus Abb. 3.1-4; <sup>d</sup> Sweet und Pritchard, 1999; <sup>e</sup> Arndt *et al.*, 2001

#### 4.3.1 Mechanistische Modelle für den rOCT2-vermittelten Transport von organischen Kationen

Mindestens zwei mechanistische Modelle könnten den untersuchten bidirektionalen Transport von organischen Kationen erklären.

- (i) rOCT2 könnte ein Kanal für lipophile Kationen sein, der die Diffusion von organischen Kationen über die Plasmamembran erleichtert, ohne dabei selbst größere Konformationsänderungen zu erfahren (siehe Abb. 4.3–1A).
- (ii) rOCT2 könnte ein Transporter mit einem zyklischen Transportschema sein, bei dem das Substrat zunächst von der einen Membranseite aus an den Transporter gebunden wird und anschließend nach einer Konformationsänderung auf der anderen Membranseite abgegeben wird. Eine zweite Konformationsänderung des nun leeren Transporters macht die Substratbindungsstelle schließlich wieder für die erste Membranseite zugänglich und vollendet so den Zyklus (siehe Abb. 4.3–1B).

Während die bisher diskutierten Ergebnisse noch keine Entscheidung zu Gunsten des einen oder anderen Modells erlauben, sprechen die weiter unten diskutierten Ergebnisse aus der Bestimmung der Leitfähigkeiten in Anwesenheit von organischen Kationen beiderseits der Membran und aus den Transstimulationsexperimenten mit Dopamin klar für das zweite Modell.



**Abb. 4.3–1 Zwei einfache Transportmodelle. A:** Kanalmodell. Der Transporter (T) kann ein organisches Kation (OC<sup>+</sup>) entweder von der extrazellulären (ex) oder zytoplasmatischen (in) Seite aus binden und wieder abgeben. Der Transport geschieht diffusionserleichternd ohne größere Konformationsänderung des Proteins. **B:** T und T̄: Transporter in auswärts- (T) und einwärtsgerichteter (T̄) Konformation. OC<sup>+</sup>: Organisches Kation; T•OC<sup>+</sup>: Konformation des Transporters mit einem gebundenen organischen Kation; ex und in: extrazelluläre und zytoplasmatische Membranseite. Der Transporter bindet das organische Kation auf einer Membranseite, unterläuft eine Konformationsänderung, gibt das organische Kation auf der anderen Seite ab, durchläuft ohne ein gebundenes Kation eine zweite Konformationsänderung und gelangt so in den Ausgangszustand zurück. Da die bisher gezeigten Ergebnisse eine starke Symmetrie bezüglich dem Einwärts- und Auswärtstransport von organischen Kationen zeigen, können die Transportschritte in beiden Modellen auch in umgekehrter Richtung laufen (Doppelpfeile).

#### 4.3.2 Inhibierung von rOCT2-vermittelten Strömen durch verschiedene Hemmstoffe

Für diese Arbeit wurden hauptsächlich Chinin, IBMX, TPA, TBA und Cadmium als Hemmstoffe für den durch rOCT2 vermittelten Transport von organischen Kationen verwendet. Es gibt noch eine Vielzahl weiterer bekannter Inhibitoren für polyspezifische Transporter für organische Kationen wie rOCT1 und rOCT2, wobei oft nicht bekannt ist, ob sie tatsächlich nicht selbst transportiert werden (Nagel *et al.* 1997; Ullrich 1997) und sicherlich lassen sich mühelos weitere bisher unbekannte finden.<sup>6</sup> Während die „patch clamp“-Methode eine einfache Unterscheidung zwischen Inhibitor und transportiertem Substrat erlaubt, war es nicht Ziel dieser Arbeit, ein *screening* geeigneter Hemmstoffe für rOCT2 durchzuführen, sondern unter Verwendung ausgewählter Inhibitoren den Transport organischer Kationen genauer zu charakterisieren.

<sup>6</sup> Von Dr. Georg Nagel und mir wurden ohne gezielte Suche erstmalig IBMX, Paraquat, Theophyllin sowie diverse Schwermetalle als Inhibitoren für rOCT2 gefunden.

### *Inhibierung durch IBMX*

Es war zunächst überraschend, dass das ungeladene IBMX ein Inhibitor für rOCT2 mit einer apparenten Affinität im mikromolaren Bereich ist. Ionisation ist jedoch kein notwendiges Kriterium für eine Wechselwirkung mit Transportern für organische Kationen (Ulrich und Rumrich 1992). Von welcher Membranseite aus die Bindung an rOCT2 stattfindet, ist mit diesen Experimenten allerdings nicht zu entscheiden, da IBMX leicht passiv durch die Oozytenmembran diffundieren kann.<sup>7</sup>

### *Inhibierung durch n-Tetra-Alkylammoniumionen*

Für die n-Tetra-Alkylammoniumionen (n-TAA) TMA, TEA, TPA und TBA nimmt die apparente Affinität zu rOCT2 wie auch die Hemmbarkeit substratinduzierter Ströme mit zunehmender Kettenlänge und damit zunehmender Hydrophobizität zu, die maximale Transportrate der n-TAA selbst aber im selben Maße ab, bis kein rOCT2-spezifischer Transport mehr feststellbar ist. Die Wechselwirkung der n-Tetra-Alkylammoniumionen von TMA bis zu Tetrapentylammonium (TPeA) beziehungsweise Tetrahexylammonium (THA) mit den Transportern für organische Kationen rOCT1 und hOCT1 wurde schon früher mit ganz ähnlichem Ergebnis untersucht (Gorboulev *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1999). Allerdings wurde in diesen Arbeiten an ganzen Zellen lediglich die Hemmung des Transports von radioaktiv markiertem TEA durch n-TAA durchgeführt, so dass nur indirekt Aussagen über den Transport der n-TAA selbst gemacht werden konnten. Im Falle der elektrischen Messungen dieser Arbeit an rOCT2 exprimierenden Oozyten ist das anders: Während die Zuführung von TMA und TEA deutliche elektrische Ströme an ganzen Zellen und im Patch vermittelte, konnten in „patch clamp“-Messungen keine von TPA oder TBA verursachten elektrischen Ströme gemessen werden. Das lässt sich nur damit erklären, dass TMA und TEA von rOCT2 über die Membran transportiert werden und TPA oder TBA nicht. Ein geringer, mit elektrischen Messungen nicht mehr aufzulösender Transport von TPA oder TBA kann zwar nicht ganz ausgeschlossen werden; dieser wäre aber im Vergleich zu den Transportraten anderer Substrate wie TMA, TEA, Cholin oder Dopamin sicherlich zu vernachlässigen. Offensichtlich erleichtert ein gewisses Maß an Hydrophobizität die Bindung an rOCT2, so dass man bei der Bindung eine Beteiligung von hydrophoben Domänen in der Bindungsregion von rOCT2 vermuten kann. Andererseits dürfen die organischen Kationen

---

<sup>7</sup> IBMX sollte ursprünglich unter Ausnutzung eben dieser Eigenschaft nach Überwindung der Plasmamembran die Phosphodiesterase hemmen und dadurch den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen.

nicht zu groß sein oder müssen auch polare Eigenschaften aufweisen, um transportiert zu werden.

#### *Inhibierung durch Cadmiumchlorid*

Cadmium und andere Schwermetalle schädigen im menschlichen Körper vor allem die Nieren. In der deutschen Bevölkerung beträgt der normale Cadmiumspiegel in Blut und Urin im Durchschnitt  $\sim 0,36 \mu\text{g/l}$  beziehungsweise  $\sim 0,29 \mu\text{g/l}$  (Seifert *et al.* 2000); das entspricht jeweils  $\sim 3 \text{ nM}$ . Dieser Spiegel ist bei Rauchern, Metallarbeitern und Personen, die in schwermetallbelasteten Gebieten wohnen, deutlich erhöht. Zwar sind exakte Grenzwerte schwer zu bestimmen, doch wird allgemein angenommen, dass sich schon eine dreifache Cadmiumbelastung nierenschädigend auswirkt (Jarup *et al.* 1998). Die im Blut zirkulierende oder mit dem Urin ausgeschiedene Menge an Cadmium ist auf den ersten Blick sehr gering. Man muss jedoch beachten, dass das Nierengewebe Cadmium stark anreichert, so dass die effektive Konzentration in den Nierenepithelzellen wahrscheinlich viel höher ist. Die kritische Konzentration für erste Nierenschäden beträgt  $\sim 200 \mu\text{g Cd/g}$  Kortexgewebe (Roels *et al.* 1999). Krankheitsbilder wie bei der Itai-Itai-Krankheit oder dem Fanconi-Syndrom weisen dabei auf eine multikausale Schädigung der gesamten Niere durch Schwermetalle hin. Im Besonderen betrifft dies die Nierentubuli, in denen es in der Regel zu einem anormalen Stofftransport wie zum Beispiel Proteinuria, Phosphaturia und Glukosuria kommt (Kazantzis *et al.* 1963; Adams *et al.* 1969). Dabei sind die molekularen Wechselwirkungen der Schwermetallionen mit Membranproteinen der Epithelialzellen weitgehend unbekannt. Man vermutet zum einen primäre Schädigungen durch direktes Binden von Cadmium an Substratbindungsstellen oder SH-Gruppen der Transportproteine und zum anderen sekundäre Schädigungen etwa durch Störung der Proteinbiosynthese oder der Energetisierung der Epithelialzellen (Bergeron und Scriver 1992; Ahn *et al.* 1999).

In dieser Arbeit wurde erstmalig demonstriert, dass Cadmium den von rOCT2 vermittelten Transport von organischen Kationen mit einer apparenten Inhibierungskonstante von  $\sim 50 \mu\text{M}$  von der extrazellulären Seite hemmt. Es ist allerdings anzunehmen, dass unter physiologischen Bedingungen Wechselwirkungen mit freien Cadmiumionen eher von der zytoplasmatischen Seite aus stattfinden (Ahn *et al.* 1999). Ahn und Mitarbeiter konnten an mit 50 bis  $200 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  vorbeladenen Vesikeln von renalen Bürstensaummembranen eine deutliche Abnahme von natriumabhängigen Transportvorgängen feststellen.

Leider ist die zytoplasmatische Zuführung von  $\text{CdCl}_2$  an „inside out“-Patches nicht ohne Weiteres möglich, da das den Badlösungen zur Unterdrückung von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten

Chloridkanälen zugesetzte EGTA nicht nur  $\text{Ca}^{2+}$ , sondern auch  $\text{Cd}^{2+}$  komplexiert. Die festgestellte Symmetrie in den Substrataffinitäten von rOCT2 lässt jedoch zumindest vermuten, dass Cadmium auch von der zytoplasmatischen Seite aus an den Transporter binden kann.

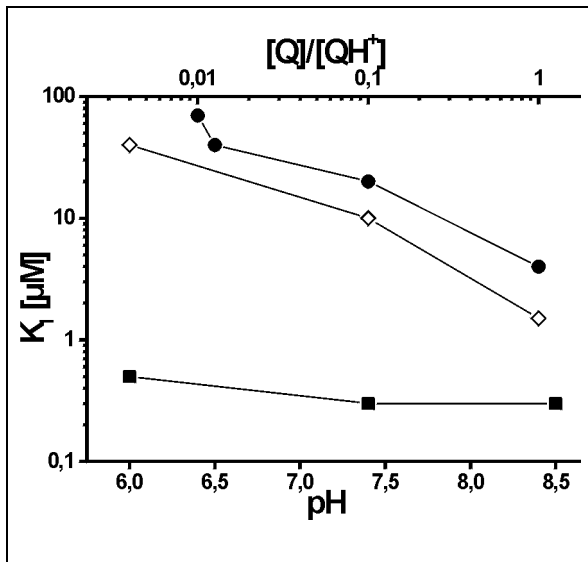
Es ist sicherlich interessant zu untersuchen, in wie weit eine Wechselwirkung von Cadmium mit Transportern für organische Kationen am Entstehen von cadmiumverursachten Krankheitsbildern beteiligt ist.

### 4.3.3 Charakterisierung der Inhibierung durch Chinin

Die Hemmung des Transportes von organischen Kationen durch Chinin wurde bereits in verschiedenen Arbeiten für rOCT1 (Nagel *et al.* 1997) und rOCT2 (Urakami *et al.* 1998; Sweet und Pritchard 1999; Arndt *et al.* 2001) am *Xenopus*-Expressionssystem demonstriert. Es wurde bei extrazellulärer Zugabe von Chinin in ganzen Zellen für die Inhibierung von TEA-induzierten Einwärtsströmen bei neutralem oder erhöhtem pH-Wert zunächst eine nichtkompetitive Hemmkinetik gefunden. Die apparente Inhibierungskonstante betrug hierbei  $\sim 10\text{--}20\ \mu\text{M}$  (Abb. 3.1–4B und Arndt *et al.* 2001).

Es war jedoch überraschend, dass im „i/o“-Patch zum einen die Affinität für Chinin von der zytoplasmatischen Seite aus viel höher war ( $K_I$ -Wert  $\sim 0,3\ \mu\text{M}$  bei Trans-Inhibierung (Abb. 3.2–13) und  $\sim 0,3\text{--}0,9\ \mu\text{M}$  bei Cis-Inhibierung (Abb. 3.2–6 und Abb. 3.2–10)) und dass zum anderen die Inhibierung von TMA-, TEA- oder cholininduzierten Strömen kompetitiv war (siehe Abb. 3.2–6). Man muss beachten, dass Chinin mit einem pK-Wert von 8,4 (Notterman *et al.* 1986) bei pH 7,4 zu 10 % in ungeladener Form vorliegt. Die Befunde der höheren Affinität und der Competition an der zytoplasmatischen Seite machten es unwahrscheinlich, dass das Chinin in den „i/o“-Patchmessungen nach Diffusion in seiner ungeladenen Form durch die Membran von der extrazellulären Seite aus inhibierte. Wahrscheinlicher ist hingegen, dass umgekehrt in den Experimenten mit ganzen Zellen das Chinin in seiner ungeladenen Form durch die Membran diffundierte und den Transport von der zytoplasmatischen Seite aus trans-inhibierte. Für die Richtigkeit dieser Annahme lieferten Experimente an ganzen Zellen (Abb. 3.1–4 und Arndt *et al.* 2001) weitere Hinweise:

- Bei erhöhtem pH-Wert, wenn vermehrt Chinin unspezifisch von den Oozyten aufgenommen wurde (Arndt *et al.* 2001), wurde die Inhibierungskonstante kleiner und die Hemmung war nichtkompetitiv (Abb. 3.1–4 und Arndt *et al.* 2001). Dies ist in Abb. 4.3–2 zusammengefasst.

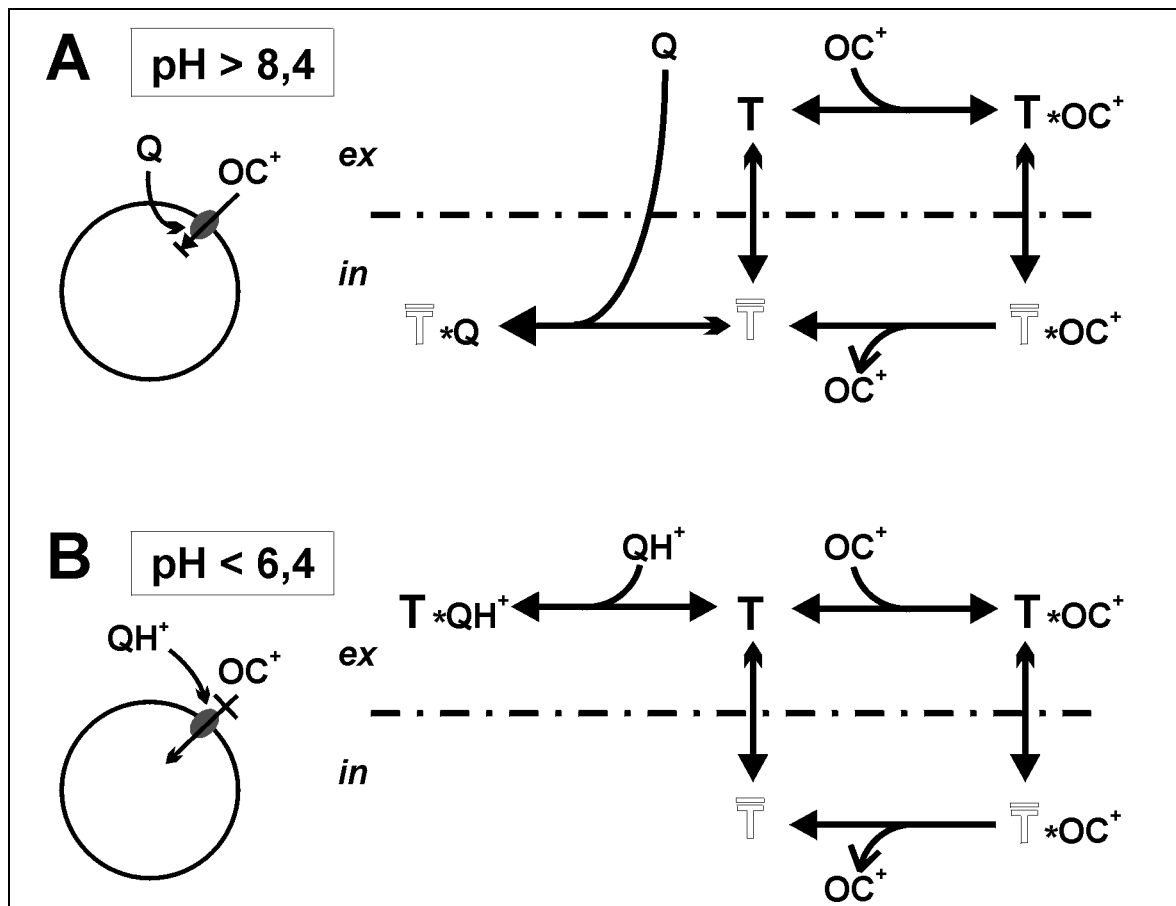


**Abb. 4.3–2 pH-Abhängigkeit der apparenten Inhibierungskonstante für Chinin.** Die aufgetragenen  $K_i$ -Werte für die pH-abhängige Hemmung von substratinduzierten Einwärtsströmen stammen für die zytoplasmatische Zugabe von Chinin aus Patchmessungen in „i/o“-Konfiguration (Quadrate) und für die extrazelluläre Zugabe von Chinin aus Messungen an ganzen Zellen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Kreise) und Flussmessungen mit radioaktiv markiertem TEA (Rauten). Die Ergebnisse der Flussmessungen und teilweise auch der „voltage clamp“-Messungen wurden aus (Arndt *et al.* 2001) entnommen. Das Verhältnis von ungeladenem zu geladenem Chinin  $[Q]/[QH^+]$  ist auf einer zweiten Abszisse aufgetragen und beträgt bei pH 6–6,5  $\leq 1 : 100$ , bei pH 7,4  $\sim 1 : 10$  und bei pH 8,4  $\sim 1 : 1$ .

- Bei erniedrigtem pH-Wert wurde eine teilweise kompetitive Hemmung (Abb. 3.1–4C) beziehungsweise eine kompetitive Hemmung (Arndt *et al.* 2001) für Chinin gefunden, was dafür spricht, dass eine Hemmung von der extrazellulären Membranseite aus mit niedrigerer Affinität zum Tragen kommt, wenn nur noch wenig Chinin ( $\sim 1\%$ ) unspezifisch die Membran passiert.
- Die Hemmung für das permanent geladene TBA war unabhängig vom pH-Wert auf der extrazellulären Seite und immer kompetitiv (Abb. 3.1–4A und Arndt *et al.* 2001).
- Nach Auswaschung von zuvor appliziertem Chinin war die Erholungszeit von der Hemmung TEA-induzierter Einwärtsströme in ganzen Zellen bei pH 8,4 gegenüber pH 6,4 stark verlangsamt. Das ist konsistent mit einer zytoplasmaseitigen Inhibierung unter der Annahme, dass über die Membran diffundiertes Chinin nicht direkt durch einen Wechsel der Badlösung ausgewaschen werden kann.

Um zu entscheiden, ob Chinin in seiner ungeladenen oder in seiner geladenen Form an rOCT2 bindet, wurden die in Abb. 3.2–13 beschriebenen „patch clamp“-Experimente in „i/o“-Konfiguration nach Vorbeladung der Patchpipette mit 2 mM Cholin durchgeführt. Die apparente Inhibierungskonstante war nicht signifikant vom pH-Wert abhängig. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte Chinin sowohl in seiner ungeladenen wie auch in seiner geladenen Form auf der zytoplasmatischen Seite an den Transporter binden und den Transport hemmen. Die Abdissoziation von Chinin erfolgt im Vergleich zur Abdissoziation von IBMX stark verlangsamt (siehe Abb. 3.2–14). Beide Raten sind langsamer als die Abdissoziation von TMA, welche mindestens so schnell wie der Lösungswechsel ( $\sim 1$  s) ist. Möglicherweise spiegelt die hohe apparente Affinität für Chinin eine langsame Abdissoziation von der Bindungsstelle wieder.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten unter Zuhilfenahme der in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Koepsell in Würzburg gewonnenen Daten darauf hin, dass Chinin auf der zytoplasmatischen Seite an die gleiche Bindungsstelle wie die von rOCT2 transportierten Substrate kompetitiv bindet; die Bindung erfolgt dabei mit höherer Affinität als auf der extrazellulären Seite. Diese Interpretation kann an einem Transportmodell (Abb. 4.3–3) verdeutlicht werden.



**Abb. 4.3–3 Modell der Inhibition durch Chinin.** **A:** Bei hohem pH-Wert liegt Chinin hauptsächlich in seiner ungeladenen Form (Q) vor und inhibiert den Transporter nach passiver Diffusion über die Plasmamembran von der zytoplasmatischen Seite nichtkompetitiv. **B:** Bei niedrigem pH-Wert liegt Chinin hauptsächlich in seiner geladenen Form (QH<sup>+</sup>) vor und inhibiert den Transporter von der extrazellulären Seite aus kompetitiv, jedoch mit schwächerer Affinität. Die Symbole sind wie in Abb. 4.3–1B bezeichnet; links sind schematisch ganze Oozyten mit einem rOCT2-Molekül dargestellt.

## **4.4 Vergleich der Strom-Spannungs-Kennlinien von Auswärts- und Einwärtsströmen**

### **4.4.1 I/U-Kennlinien von Auswärtsströmen**

I/U-Kennlinien von substratinduzierten elektrischen Auswärtsströmen zeigen positive Steigungen. Ein Ausfluss von organischen Kationen mit einer ähnlichen Spannungsabhängigkeit wurde bereits für rOCT1 vorgeschlagen, indem an cholininkubierten Oozyten elektrische Auswärtsströme indirekt durch Subtraktion von chinininhibierten Strömen gemessen wurden (Nagel *et al.* 1997). Ein Nachteil dieser Messungen war die unbekannte Konzentration von organischen Kationen im Zytoplasma. In dieser Arbeit konnten Messungen an „i/o“-Patches bei frei wählbaren zytoplasmatischen Konzentrationen von organischen Kationen durchgeführt werden. Es zeigte sich für die Auswärtsströme selbst bei sättigenden Konzentrationen (siehe Abb. 3.2–8B und Abb. 3.2–9C) eine leichte Spannungsabhängigkeit. Dieser Befund deutet in Bezug auf den Transportmechanismus darauf hin, dass im Transportzyklus ein Ladungs-Translokationsschritt oder eine potenzialabhängige Verteilung zwischen zwei Zuständen des Transporters ratenlimitierend sein könnte (Hansen *et al.* 1981; Läger 1991).

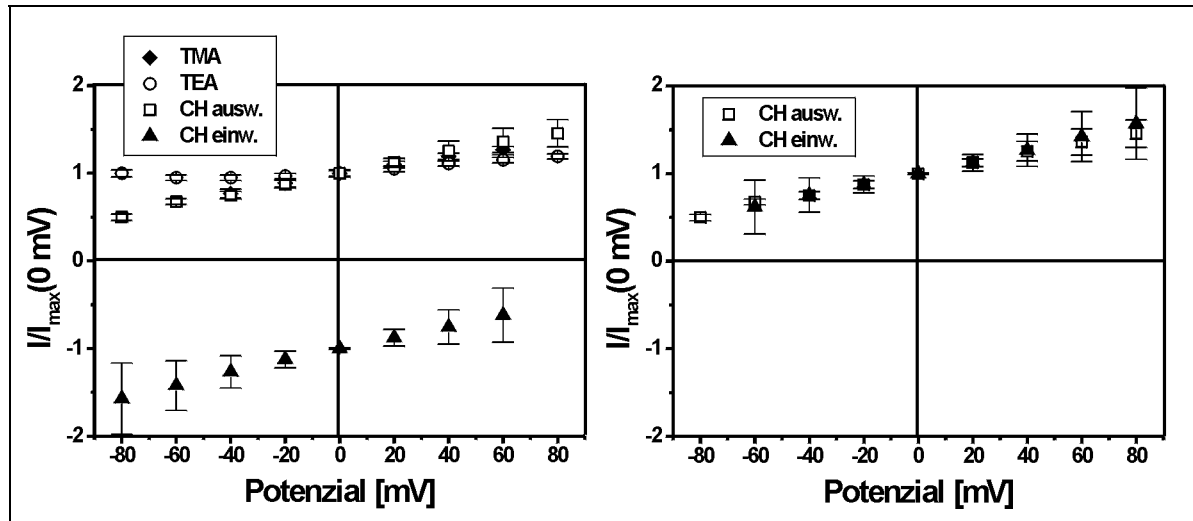
Ein Vergleich der I/U-Kennlinien von durch TMA, TEA oder Cholin verursachten Auswärtsströmen in „i/o“-Patches zeigt, dass sich die Spannungsabhängigkeit des Transportes bei verschiedenen Substraten nicht wesentlich unterscheidet (Abb. 4.4–1A). Die im Vergleich zur Steigung der Kennlinien für Cholin und TMA flachere Steigung der Kennlinie für TEA könnte damit zusammenhängen, dass für TEA, das eine höhere Affinität und niedrigere Transportrate als TMA hat, ein nichtelektrogener Schritt zunehmend die Geschwindigkeit des gesamten Transportzyklus bestimmt.

Die apparente Bindungsaffinität für organische Kationen von der zytoplasmatischen Seite aus zeigt ebenso eine leichte Spannungsabhängigkeit (siehe Abb. 3.2–8C und Abb. 3.2–9E), was zum einen durch einen Spannungsabfall entlang der zytoplasmatischen Bindungsstelle (Läger 1991) oder durch eine potentialabhängige Verteilung zwischen zwei Zuständen des leeren Transporters verursacht sein könnte.

Die in dieser Arbeit bestimmte Spannungsabhängigkeit von cholininduzierten Auswärtsströmen bei verschiedenen nicht-sättigenden Cholinkonzentrationen lässt einen



Auswärtstransport von Cholin bei physiologischem Membranpotenzial durchaus möglich erscheinen, falls die externe Cholinkonzentration niedrig genug ist.



**Abb. 4.4–1 Vergleich von maximalen Auswärts- und Einwärtsströmen für verschiedene Substrate. A:** Gemeinsame Auftragung der Maximalströme aus den Abbildungen Abb. 3.2–8B, Abb. 3.2–9C, Abb. 3.2–9D und Abb. 3.2–12B für cholin- (CH), TMA- und TEA-induzierte Auswärtsströme und cholininduzierte Einwärtsströme. Die Spannungsabhängigkeit von  $I_{\max}$  ist für die unterschiedlichen Substrate nicht sehr verschieden. **B:** Vergleich der maximalen Auswärts- und Einwärtsströme für Cholin durch Punktspiegelung der Einwärtsströme am Achsenursprung.

#### 4.4.2 I/U-Kennlinien von Einwärtsströmen

Die I/U-Kennlinien von substratinduzierten elektrischen Einwärtsströmen in „o/o“-Patches und in „i/o“-Patches nach Vorbeladung der Pipette mit Substrat zeigen eine positive Steigung. Sie bestätigen die ganz ähnliche Spannungsabhängigkeit für Einwärtsströme, die für rOCT1 (Nagel *et al.* 1997) und rOCT2 (Arndt *et al.* 2001) mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an ganzen Oozyten gefunden wurde. Wie auch bei den Auswärtsströmen zeigten die I/U-Kennlinien der Einwärtsströme selbst bei sättigenden Konzentrationen ( $I_{\max}$ /U-Kennlinien) eine leichte Spannungsabhängigkeit. Die Spannungsabhängigkeit der apparenten Bindungskonstanten war ebenso spannungsabhängig und deutet auf eine spannungsabhängige Substratbindung von der extrazellulären Seite oder eine spannungsabhängige Verteilung von zwei Zuständen des leeren Transporters hin.

#### 4.4.3 Vergleich der I/U-Kennlinien von Auswärts- und Einwärtsströmen

Vergleicht man die Spannungsabhängigkeiten der Einwärtsströme und Auswärtsströme, fällt einem eine starke Symmetrie in den I/U-Kennlinien und in der Spannungsabhängigkeit der apparenten Bindungskonstanten auf. In Abb. 4.4–1B erkennt man nach Punktspiegelung der

durch Cholin induzierten Einwärtsströme am Achsenursprung, dass der Transport von Cholin sehr symmetrisch vor sich geht. Dies wird noch direkter bei den Messungen mit Cholin oder TMA in der Patchpipette deutlich, auf die in Kapitel 4.4.5 eingegangen wird.

Die Symmetrie des Transportes kann man ebenso anhand der Spannungsabhängigkeiten der zytoplasmatischen und extrazellulären Affinitäten sehen. Während sich die apparenten Bindungskonstanten bei Bindung von der zytoplasmatischen Seite aus bei positiven Membranpotenzialen kaum ändern und zu negativen Potenzialen hin ansteigen, ist es für die extrazelluläre Bindung von Cholin genau umgekehrt (siehe Abb. 3.2–8C, Abb. 3.2–9E, Abb. 3.2–9F und Abb. 3.2–12C). Im Hinblick auf die Elektrogenität des Transporters fällt auf, dass die Spannungsabhängigkeiten insgesamt nicht sehr ausgeprägt sind. Man könnte vermuten, dass spannungsabhängige und nichtspannungsabhängige Teilschritte im Transportzyklus ähnlich schnell sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Transporter rOCT2 aufgrund seiner elektrogenen Eigenschaften genauso gut für einen Auswärtstransport wie für einen Einwärtstransport von organischen Kationen geeignet ist.

#### **4.4.4 Elektrochemisches Potenzial als treibende Kraft für den Transport von organischen Kationen**

Die Zuordnung der kürzlich klonierten Transporter der OCT-Familie zu den schon vor Beginn der neunziger Jahre beschriebenen Transportsystemen der Niere gestaltete sich überraschenderweise als sehr schwierig. In der Literatur ist kontrovers diskutiert worden, ob der Transporter für organische Kationen 2 mit dem luminalen Organische-Kationen/Protonen-Austauscher identisch ist (Okuda *et al.* 1996; Grundemann *et al.* 1997). Auch die Frage nach der basolateralen oder luminalen Lokalisation war umstritten. Während Okuda *et al.* keine pH-Abhängigkeit des durch rOCT2 vermittelten Transports messen konnten und deshalb rOCT2 als (basolaterales) potenzialgetriebenes Transportsystem charakterisierten, fanden Grundemann *et al.* eine pH-Abhängigkeit und schlugen vor, dass rOCT2 ein (apikaler)  $\text{OC}^+/\text{H}^+$ -Austauscher ist. Mittlerweile mehrten sich die Anzeichen, dass rOCT2 ein potenzialabhängiger Transporter ist (Sweet und Pritchard 1999) und basolateral lokalisiert ist (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Koepsell).

In dieser Arbeit bot die Vorbeladung der Patchpipette mit organischen Kationen bei „patch clamp“-Messungen eine exzellente Möglichkeit, den Einwärts- und den Auswärtstransport von organischen Kationen potenzialabhängig in ein und derselben

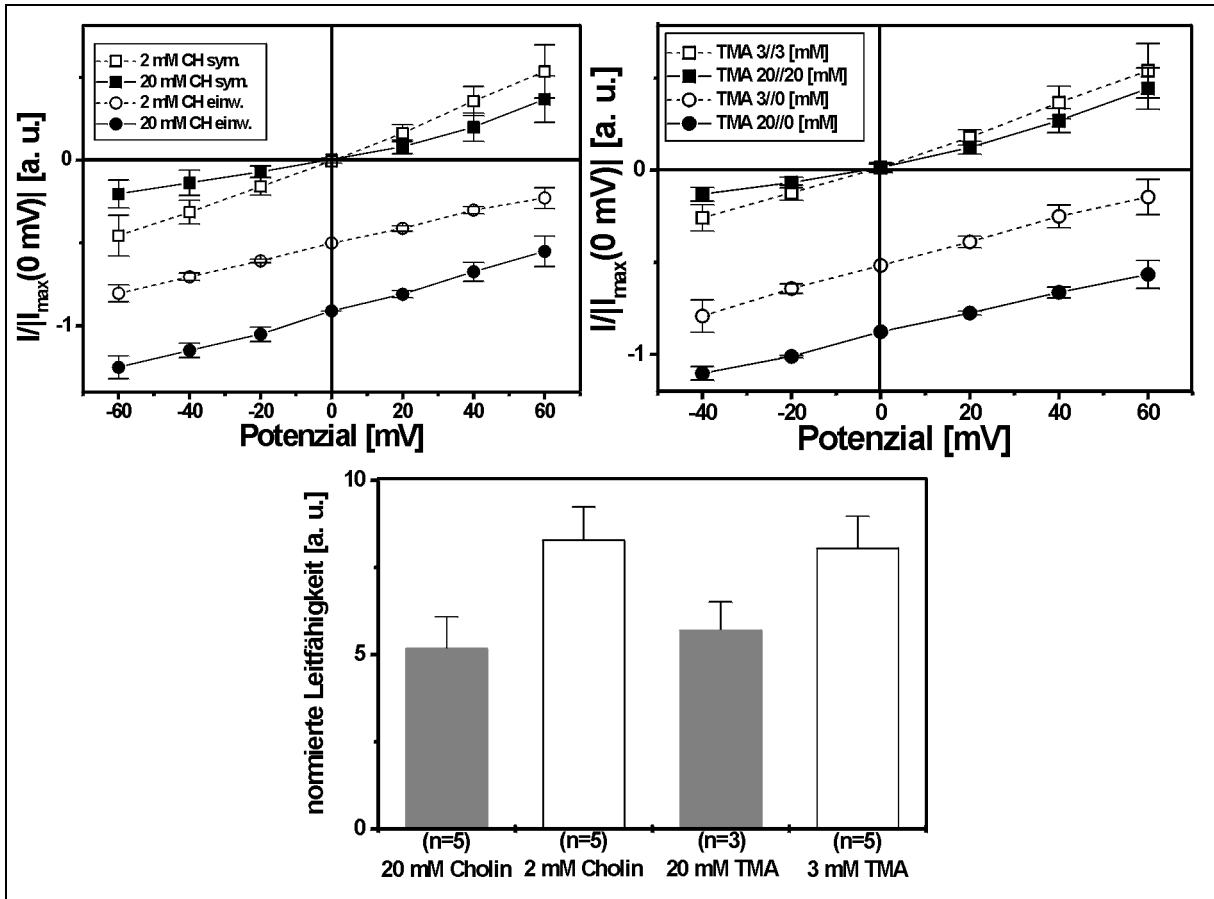
Messung direkt zu vergleichen und so die treibenden Kräfte für den Transport zu untersuchen. Die durchgeführten Experimente bei verschiedenen Substratkonzentrationsgradienten über die Patchmembran in Abhängigkeit des Membranpotenzials belegen eindeutig, dass das elektrochemische Potenzial für den durch rOCT2 vermittelten Transport von organischen Kationen verantwortlich ist; die gemessenen Umkehrpotenziale stimmen sehr gut mit den nach Gleichung (1) berechneten Nernstpotenzialen überein. Dieses Ergebnis identifiziert rOCT2 eindeutig als passives Transportsystem für organische Kationen und beendet damit die Diskussion, ob Transporter der OCT-Familie mit dem luminalen Organische-Kationen/Protonen-Austauscher identisch sind.

#### **4.4.5 I/U-Kennlinien beim Austausch von organischen Kationen gegen organische Kationen**

Bei der Entscheidung, welches der beiden in Kapitel 4.3.1 eingeführten mechanistischen Modelle den durch rOCT2 vermittelten Transport von organischen Kationen besser beschreibt, sind Untersuchungen zur Spannungsabhängigkeit von substratinduzierten Leitfähigkeiten hilfreich. Zwar können Leitfähigkeiten von verschiedenen Patchmessungen nicht direkt miteinander verglichen werden, doch können die Strom-Spannungs-Kennlinien wie in Abb. 4.4–2 gezeigt normiert und in einem Graphen aufgetragen werden.

In Abb. 4.4–2A wurden die durch extrazellulär 2 mM Cholin (bei „unendlichem Konzentrationsgradienten“) verursachten elektrischen Einwärtsströme auf  $-0,5$  bei 0 mV Membranpotenzial normiert. Dazu wurde eine apparente Bindungskonstante von  $K_{0,5} = 2$  mM für die extrazelluläre Seite angenommen, die mit „outside out“-Messungen in etwa bestätigt werden konnte. Die korrespondierende I/U-Kennlinie vom selben Patch unter „symmetrischen“ Bedingungen, also mit 2 mM Cholin auf beiden Membranseiten, wurde ebenfalls aufgetragen. Analog wurden Ströme von Messungen mit extrazellulär 20 mM Cholin und keinem Cholin im Bad auf  $-0,91$  bei 0 mV normiert (wieder mit  $K_{0,5} = 2$  mM) und zusammen mit der entsprechenden I/U-Kennlinie für beidseitig 20 mM Cholin in demselben Graphen aufgetragen. Vergleicht man nun wie in Abb. 4.4–2C die normierten Leitfähigkeiten mit jeweils 2 mM Cholin oder 20 mM Cholin auf beiden Seiten, so stellt man fest, dass die Leitfähigkeit für 20 mM Cholin signifikant kleiner ist (ANOVA-Test,  $p = 0,04$ ). In Abb. 4.4–2B wurden I/U-Kennlinien für 3 mM beziehungsweise 20 mM TMA in der Patchpipette ganz analog aufgetragen, wobei unter der Annahme einer Symmetrie in den extrazellulären und zytoplasmatischen Substrataffinitäten für die Normierung eine

extrazelluläre apparente Bindungskonstante von  $K_{0,5} = 2,8$  mM benutzt wurde. Ein Vergleich der normierten Leitfähigkeiten in Abb. 4.4–2C zeigt wiederum eine geringere Leitfähigkeit bei höheren Substratkonzentrationen, allerdings ist der Unterschied im Rahmen der Fehler im Falle von TMA nicht signifikant (ANOVA-Test,  $p = 0,17$ ).



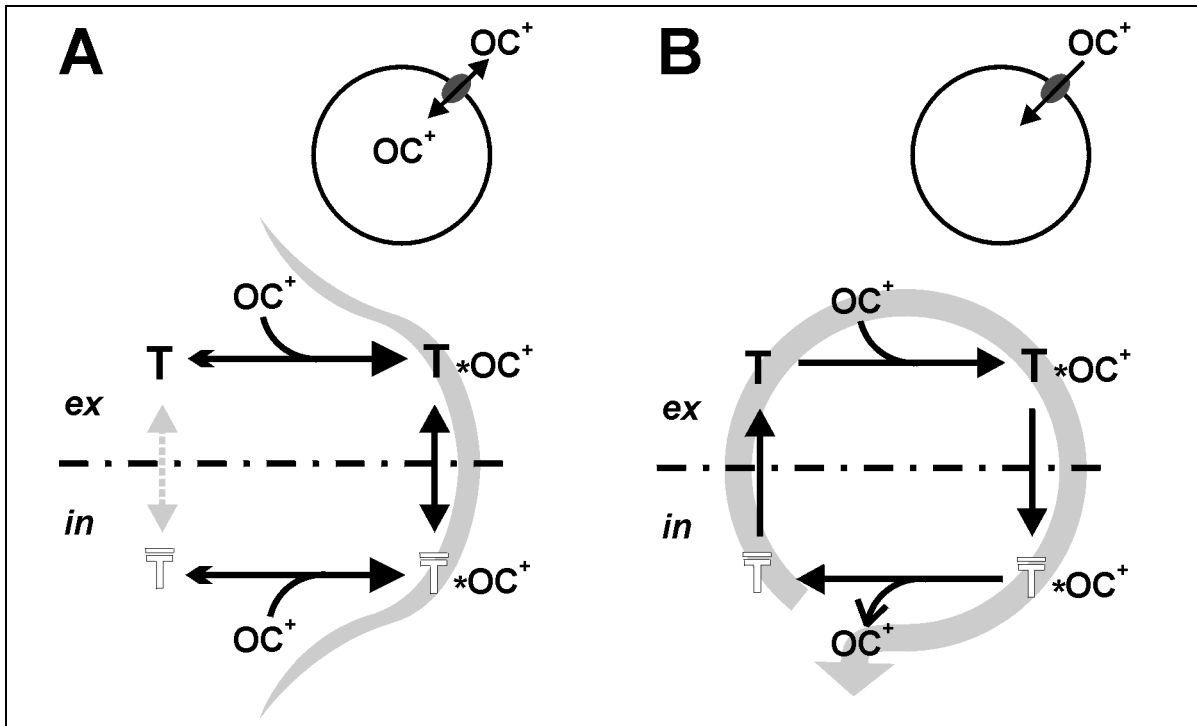
**Abb. 4.4–2 Normalisierte I/U-Kennlinien bei Vorbeladung der Pipette mit Substrat. A:** Normalisierte I/U-Kennlinien von cholininduzierten elektrischen Einwärtsströmen (CH einw.) und Strömen unter bezüglich der Patchmembran symmetrischen Cholin-konzentrationen (CH sym.). Offene und gefüllte Symbole kennzeichnen 2 mM und 20 mM Cholin in der Pipette, Quadrate stehen für Ströme unter symmetrischen Bedingungen (mit derselben Cholin-konzentration in Pipette und Bad) und Kreise kennzeichnen durch Cholin induzierte Einwärtsströme (unter asymmetrischen Bedingungen, das heißt ohne Substrat im Bad). Alle Ströme wurden zu den maximalen Einwärtsströmen bei 0 mV Membranpotenzial und asymmetrischen Bedingungen normiert unter der Annahme einer apparenten Bindungskonstante für den Einwärtstransport von Cholin von  $K_{0,5} = 2$  mM. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus jeweils fünf einzelnen Patchexperimenten für jede Mess-Konfiguration. **B:** Normalisierte I/U-Kennlinien analog zu **A**, jedoch mit 3 mM und 20 mM TMA in der Pipette (offene und gefüllte Symbole). Zur Normierung wurde  $K_{0,5} = 2,8$  mM für TMA-induzierte Einwärtsströme bei 0 mV angenommen. Es wurden fünf Patchexperimente mit 3 mM TMA und drei mit 20 mM TMA in der Pipette gemittelt. **C:** Normierte Leitfähigkeiten bei Anwesenheit von sättigenden und halbsättigenden Substratkonzentrationen beiderseits der Patchmembran (symmetrische Bedingungen). Die Steigungen der einzelnen (nicht gemittelten) I/U-Kennlinien unter symmetrischen Bedingungen der Experimente aus **A** und **B** (Quadrate) wurden durch Annäherung von Regressionsgeraden bestimmt, gemittelt und in willkürlichen Einheiten aufgetragen. Diese Werte sind zu den mittleren Patchmembranleitfähigkeiten unter den jeweiligen Bedingungen proportional. Zur Ermittlung, ob die Steigungen bei halbsättigenden Konzentrationen (2 mM Cholin und 3 mM TMA) von denen bei sättigenden Konzentrationen (je 20 mM Cholin oder TMA) verschieden sind, wurden ANOVA-Tests mit den ungemittelten Daten durchgeführt. Im Falle von Cholin sind die Steigungen signifikant unterschiedlich, bei TMA jedoch nicht.

Eine Abnahme der Leitfähigkeit bei hohen Substratkonzentrationen wie diese wurde bisher bei Ionenkanälen noch nicht festgestellt (Hille 1992). Für viele Kanäle konnte sogar eine Michaelis-Menten-artige Sättigung der Einzelkanalleitfähigkeit beobachtet werden (Hille 1992). Theoretische Betrachtungen lassen allerdings eine Abnahme der Leitfähigkeit mit zunehmender Substratkonzentration zu, nämlich im Falle einer Bindung von mehreren Substrationen gleichzeitig im Ionenkanal (Hille 1992). Ein kanalähnlicher Transportmechanismus kann daher für rOCT2 nicht ganz ausgeschlossen werden, erscheint aber relativ unwahrscheinlich.

Eine naheliegende Erklärung für die Abnahme der Leitfähigkeit bei hohen Substratkonzentrationen auf beiden Seiten der Plasmamembran bietet ein Transportmechanismus für rOCT2, bei dem der Transporter unter beiderseits nahezu sättigenden Substratkonzentrationen kaum unbeladen ist, sondern die meiste Zeit ein organisches Kation gebunden hat, welches durch Konformationsänderungen des Proteins mal in der einen und dann in der anderen Richtung über die Membran transportiert wird (siehe Abb. 4.4–3A). Da in diesem Modus jeweils nur Halbzyklen in die eine und die andere Richtung durchlaufen werden, ist der Austausch von organischen Kationen gegen organische Kationen ( $OC^+/OC^+$ -Austausch) notwendigerweise elektroneutral. Die beobachtete geringe Restleitfähigkeit wäre demnach auf die Spannungsabhängigkeit der apparenten Bindungskonstante zurückzuführen und sollte bei theoretisch unendlich hohen Substratkonzentrationen gegen null gehen.

Dieses Modell verlangt im Falle eines gerichteten Transports bei einem „unendlichen“ Substratgradienten, das heißt in Abwesenheit von Substrat auf einer der beiden Membranseiten, nach Freisetzung eines organischen Kations auf der substratfreien Seite einen Transferschritt des leeren Transporters zurück, um die Bindungstasche auf der anderen Membranseite wieder für das nächste Kation zugänglich zu machen, dieses über die Membran zu transportieren und den Zyklus somit zu komplettieren (siehe Abb. 4.4–3B). Es ist durchaus wahrscheinlich, dass dieser Transferschritt mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergeht, bei der negative Ladungen (teilweise) verschoben werden, die durch die Bindung eines organischen Kations kompensiert oder überkompensiert werden können. Ein ähnlicher Mechanismus wurde zum Beispiel für die  $K^+$ -transportierende ATPase aus *Escherichia coli* vorgeschlagen (Fendler *et al.* 1999).

In rOCT1 spielt das Aspartat 475 eine wichtige Rolle bei der Substratbindung (Gorboulev *et al.* 1999). Dieses Aspartat ist auch in rOCT2 konserviert. Vor-Gleichgewichtsmessungen mit Spannungs- oder Konzentrationssprüngen könnten dazu beitragen, Ladungstransferschritte des beladenen oder unbeladenen Transporters zu identifizieren (Nakao und Gadsby 1986; Fendler *et al.* 1987; Friedrich und Nagel 1997, siehe auch Kapitel 4.2.4).



**Abb. 4.4–3 Transportmechanismus bei Austausch von organischen Kationen und bei gerichtetem Transport.** **A:** Austausch von organischen Kationen bei sättigenden Substratkonzentrationen beiderseits der Membran. Die grau unterlegte Linie soll den Wechsel des Transporters zwischen den beiden mit Substrat beladenen Konformationen andeuten. **B:** Gerichteter Transport bei unendlichem Substratkonzentrationsgradienten. Der Zyklus wird hauptsächlich im Uhrzeigersinn durchlaufen. Die Symbole sind wie in Abb. 4.3–1B bezeichnet; über den Abbildungen sind schematisch ganze Oozyten mit einem rOCT2-Molekül dargestellt.

## **4.5 Transstimulierbarkeit des Transports von organischen Kationen**

Wie im letzten Kapitel anhand von elektrischen Leitfähigkeitsmessungen erläutert worden ist, kann der Transporter rOCT2 in Anwesenheit von organischen Kationen auf beiden Seiten der Membran wahrscheinlich als  $OC^+/OC^+$ -Austauscher funktionieren. Wegen der Ununterscheidbarkeit der elektrischen Ladungen konnten jedoch die einwärts und auswärts gerichteten Flüsse der organischen Kationen nicht einzeln gemessen werden: Es ist prinzipiell mit elektrischen Messungen alleine nicht zu unterscheiden, ob der Transporter bei nahezu sättigenden Substratkonzentrationen beiderseits der Membran transstimuliert wird oder im Extremfall sogar vollkommen inhibiert wird. Die mögliche Transstimulierbarkeit des Transports von organischen Kationen wäre ein weiteres Indiz für das in dieser Arbeit vorgeschlagene Transportermodell. Außerdem könnte eine Klärung dieser Frage dazu beitragen, die physiologische Rolle von rOCT2 genauer zu definieren.

### **4.5.1 Amperometrischer Nachweis von rOCT2-vermitteltem Dopamintransport**

Die Messungen mit der amperometrischen Spannungsklemme verbinden die Vorteile einer elektrischen Messung wie die Kontrollierbarkeit des Membranpotenzials mit dem Nachweis eines transmembranären Stofftransports mittels selektiver Oxidation an einer Carbonfaser-Elektrode. Mit den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Kontrollexperimenten konnten folgende Sachverhalte gezeigt werden, die die Anwendbarkeit der amperometrischen Spannungsklemme für Untersuchungen an Transportern für organische Kationen belegen:

- Die gleichzeitige Messung von Redox-Strömen mit der Carbonfaser-Elektrode und von elektrischen Strömen mit der Stromelektrode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist möglich. Dabei kann die Oozytenmembran auf verschiedene Haltepotenziale geklemmt werden, ohne dass die amperometrische Messung nennenswert beeinflusst wird. Auch die elektrischen Ströme verlaufen genauso, wie man es in Experimenten ohne Carbonfaser-Elektrode erwarten würde.
- Nicht-injizierte Kontroll-Oozyten nehmen kein Dopamin auf oder zumindest so wenig, dass mit der Carbonfaser-Elektrode kein Ausstrom nachgewiesen werden kann.

- Selbst bei rOCT2 exprimierenden Oozyten ist ohne vorherige Inkubation in dopaminhaltiger Lösung kein Ausstrom von (endogenem) Dopamin oder von anderen, leicht oxidierbaren Substanzen nachweisbar.
- Nach Inkubation in dopaminhaltiger Lösung zeigen rOCT2 exprimierende Oozyten einen deutlichen, spezifisch durch Chinin hemmbaren Ausstrom von Dopamin, der über längere Zeit anhält und dabei langsam schwächer wird. Die Vorbeladung der Oozyten mit Dopamin ist reversibel. Nach Lagerung in dopaminfreier ORi für einige Stunden ist kein Ausstrom von Dopamin mehr nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Anwendung dieser Kombination aus zwei Techniken die Versuchsbedingungen gut kontrollierbar bleiben und ein durch rOCT2 vermittelter Transport von Dopamin von unspezifischen Vorgängen eindeutig unterscheidbar ist. Diese neuartige Methode bietet hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Untersuchung von Transportern für organische Kationen vielfältige Möglichkeiten.

#### **4.5.2 Transstimulation des Dopaminausstroms durch Cholin**

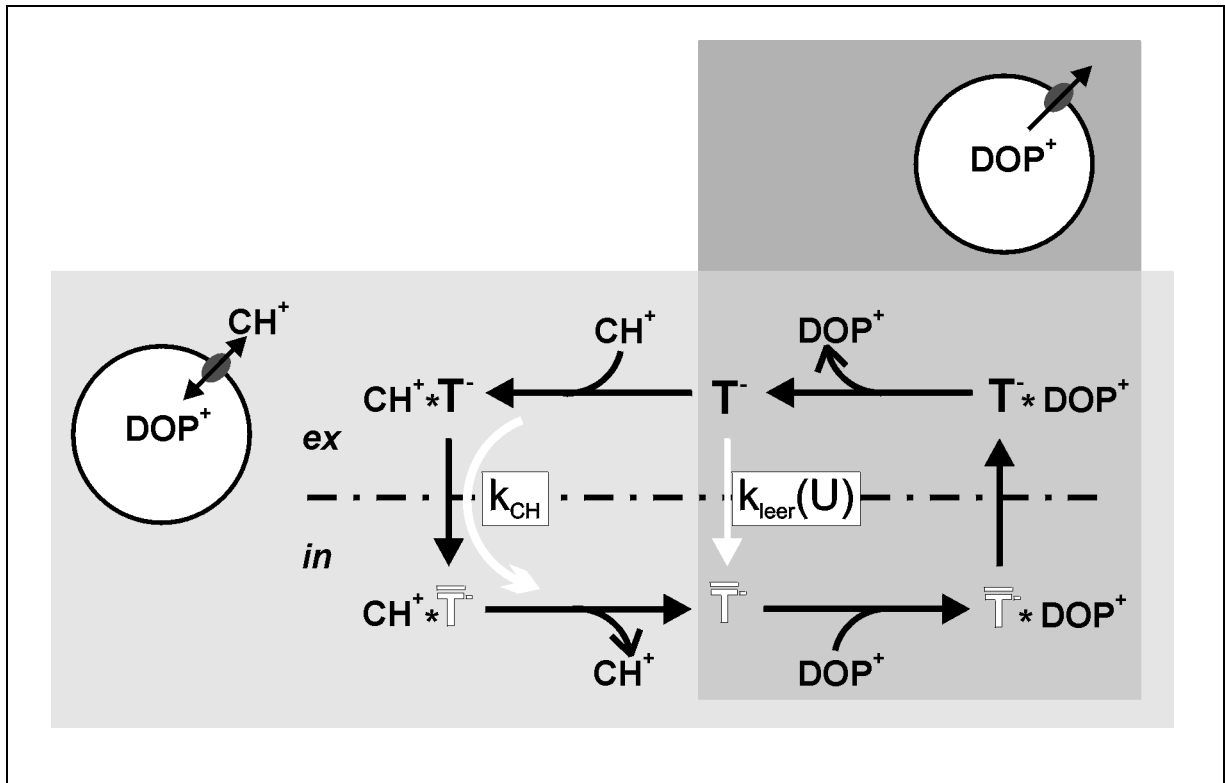
Die durchgeführten Experimente mit der amperometrischen Spannungsklemme belegen, dass unter gewissen Umständen eine Transstimulation des Dopaminausstroms durch Cholin möglich ist. Das Membranpotenzial scheint einen erheblichen Einfluss auf das Auftreten einer Transstimulation oder einer Transinhibierung auszuüben. Allerdings legen starke Unterschiede in den Messungen einzelner Oozyten und selbst innerhalb einer Messung (wie in Abb. 3.3–5) nahe, dass bei der Bestimmung des Transportverhaltens von rOCT2 auch andere Parameter wie etwa die intrazelluläre Dopaminkonzentration eine Rolle spielen könnten.

Die Spannungsabhängigkeit des Dopaminausstroms bei einem „unendlichen“ Konzentrationsgradienten verhält sich so, wie es für einen elektrogenen Auswärtstransport erwartet wird und in den elektrischen Messungen für Cholin und TMA gezeigt wurde: die Steigung der  $I_{\text{amp}}/U$ -Kennlinie ist linear und positiv. In Anwesenheit von extrazellulär 5  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  Chinin sind die Ausströme etwa halb so groß. Eine Hemmung in dieser Größenordnung ist nicht überraschend, da die extrazelluläre Hemmung von TEA-induzierten Einstömen durch Chinin mit einer apparenten Inhibierungskonstante von  $K_I = 10\text{--}20 \mu\text{M}$  geschieht.

Betrachtet man sich die  $I_{\text{amp}}/U$ -Kennlinie in Anwesenheit von Cholin auf der extrazellulären Seite, so stellt man fest, dass die Steigung flacher als bei einem „unendlichen“ Konzentrationsgradienten und fast sogar waagerecht ist. Dies ist in guter Übereinstimmung



mit dem vorgeschlagenen Transportmodell im Austauschmodus. Zunächst bindet ein Dopaminion von der zytoplasmatischen Seite aus an den Transporter, wird über die Membran transportiert und im extrazellulären Medium freigesetzt. Anschließend wird ein Cholinion gebunden, einwärts transportiert und im Zytoplasma freigesetzt. Dieser Vorgang kann sich wiederholen, ohne dass es zwischenzeitlich zu einer Konformationsänderung des leeren Transporters kommen muss (siehe Abb. 4.5–1). Die Elektroneutralität dieser zwei Halbzyklen zusammen schlägt sich auch in den amperometrischen Messungen wieder.



**Abb. 4.5–1 Transportmechanismus bei Austausch eines Dopaminions gegen ein Cholinion.** Dopamin (Dop<sup>+</sup>) wird aus einer vorbeladenen Oozyte heraustransportiert und auf der extrazellulären Seite abgegeben (rechte Seite des Schemas). In Abwesenheit von Substrat auf der extrazellulären Seite muss der Transporter unbeladen in die Ausgangsstellung zurückkehren (dunkel unterlegter Teil des Schemas). Trägt der unbeladene Transporter eine negative Teilladung, so ist dieser Schritt spannungsabhängig (Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{leer}}(U)$ ). In Anwesenheit von extrazellulärem Cholin (CH<sup>+</sup>) kann der Transporter dieses binden und in die Zelle transportieren (hell unterlegter Teil des Schemas). Der komplette Austauschzyklus ist dabei spannungsunabhängig (durch die spannungsunabhängige Geschwindigkeitskonstante für den Cholintransport  $k_{\text{CH}}$  angedeutet). Wenn  $k_{\text{CH}} > k_{\text{leer}}(U)$  ist (zum Beispiel bei stark negativem Membranpotenzial), kommt es zur Transstimulation des Dopaminausstroms durch Cholin.

Interessant ist nun, dass sich die beiden  $I_{\text{amp}}/U$ -Kennlinien auf Grund ihrer unterschiedlichen Steigungen irgendwo schneiden müssen. Zu negativeren Potenzialen hin kommt es zu einer Transstimulation, zu positiven Potenzialen hingegen zu einer Transinhibierung des Dopaminausstroms durch Cholin. Dies soll im Folgenden am Transportmodell erläutert werden. Dazu sei angenommen, dass der leere Transporter eine negative Teilladung trägt, die durch die Bindung eines organischen Kations neutralisiert werden kann. Man stelle sich weiterhin eine mit Dopamin vorbeladene und bei einem negativen Membranpotenzial geklemmte rOCT2 exprimierende Oozyte vor. Bei einem „unendlichen“ Konzentrationsgradienten muss der Transporter nach extrazellulärer Freisetzung des Dopamins unbeladen zurückkehren und dabei seine negative Teilladung gegen das negative Membranpotenzial verschieben. Wenn die Membran noch stärker hyperpolarisiert wird, so verlangsamt sich die spannungsabhängige Transportrate des leeren Transporters, die mit  $k_{\text{leer}}(U)$  bezeichnet werden soll. In Anwesenheit von Cholin auf der extrazellulären Seite hingegen kann der Transporter die negative Teilladung durch Bindung eines Cholinions (teilweise) ausgleichen, so dass die Geschwindigkeit des Rückschrittes bei Beladung mit Cholin,  $k_{\text{CH}}$ , vom Membranpotenzial weniger abhängig ist. Bei einem ausreichend negativen Potenzial ist die extrazelluläre Bindung, Translokation und zytoplasmatische Freisetzung eines Cholinions schneller als die Konformationsänderung des leeren Transporters gegen das elektrische Feld, also  $k_{\text{CH}} > k_{\text{leer}}(U)$ , so dass es in Anwesenheit von Cholin zu einer Transstimulation des Dopaminauswärtstransports kommt. Für hypopolarisierende Potenziale gilt Entsprechendes umgekehrt. Es kommt zu einer im Vergleich zur Translokation des Cholinions schnelleren Konformationsänderung des unbeladenen Transporters und damit zu einer Transinhibierung des Dopaminauswärtstransports ( $k_{\text{CH}} < k_{\text{leer}}(U)$ ). Diese Überlegung gilt übrigens auch analog, wenn der unbeladene Transporter keine negative Teilladung trägt; dann allerdings sind die Transferschritte mit gebundenem Substrat stärker von der Spannung abhängig als die ohne Substrat. Es kommt bei dem Austausch von organischen Kationen letztlich nur darauf an, dass im Gesamtzyklus netto keine Ladung verschoben wird und dieser dadurch zwangsläufig spannungsunabhängig ist.

#### 4.6 Physiologische Rolle von rOCT2

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Transporter für organische Kationen rOCT2 ein durch das elektrochemische Potenzial getriebener elektrogener Transporter ist. Der Transport von organischen Kationen ist symmetrisch bezüglich der zytoplasmatischen und extrazellulären Membranseite und kann durch den Gegentransport anderer organischer Kationen transstimuliert werden. Der Transporter rOCT2 ist damit ein Protein, welches ohne Einschränkung die von Holohan und Ross beschriebenen Anforderungen an ein basolaterales Transportsystem für organische Kationen erfüllt (Holohan und Ross 1980).

Die meisten organischen Kationen werden von den Nieren ausgeschieden, indem sie von ihrem elektrochemischen Potenzial getrieben durch Transporter für organische Kationen über die Basolateralmembran der renalen Bürstensaumzellen transportiert werden. Anschließend werden sie gegen das Membranpotenzial aktiv von einem Organische-Kationen/Protonen-Austauscher in den sauren Urin transportiert (Holohan und Ross 1980). Für Cholin wurde jedoch unter physiologischen Bedingungen eine Netto-Reabsorption gefunden (Besseghir *et al.* 1981). Während der erste Schritt vom Lumen in die Bürstensaumzellen von einem luminalen Cholintransporter vermittelt werden sollte, ist der Transportmechanismus über die Basolateralmembran unklar. Transstimulationsexperimente ließen vermuten, dass für diesen Transportschritt ein Austauscher für organische Kationen verantwortlich ist, der unter Umständen mit dem potenzialgetriebenen Transporter für organische Kationen identisch ist (Acara und Rennick 1973; Sokol und McKinney 1990; Dantzer *et al.* 1991). Leider blieb wegen widersprüchlicher Ergebnisse sogar am gleichen Mess-System die Frage ungeklärt, ob und unter welchen Umständen eine Transstimulation möglich ist (Dantzer *et al.* 1991; Dantzer *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1999).

Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Transportmechanismus könnte helfen, den Reabsorptionsweg von Cholin und seine physiologische Rolle zu klären. Zunächst einmal konnte gezeigt werden, dass Cholin von rOCT2 gegen ein Membranpotenzial von  $-70$  mV über die Basolateralmembran nach außen transportiert werden kann, ohne dass eine übermäßige Reduktion der maximalen Transportrate auftritt, weil die Spannungsabhängigkeit des Transports relativ schwach ist. Bis zu einem Konzentrationsgradienten von  $15 : 1$  sollte nach der Nernstgleichung bei  $-70$  mV ein Auswärtstransport noch stattfinden. Es wäre interessant, die tatsächliche Cholinkonzentration in den Bürstensaumzellen unter physiologischen Bedingungen zu kennen. Da die kritische Konzentration für die

Cholinausscheidung  $\sim 100 \mu\text{M}$  Cholin im Plasma beträgt (Besseghir *et al.* 1981), müsste die intrazelluläre Cholinkonzentration in den Bürstensaumzellen mindestens  $1,5 \text{ mM}$  betragen. Ein Gegentransport eines anderen organischen Kations wäre unter diesen Bedingungen für eine Reabsorption von Cholin nicht notwendig. Stattdessen wäre es sogar denkbar, dass ein Auswärtstransport von Cholin den Einwärtstransport von anderen organischen Kationen erleichtert, falls der Translokationsschritt bei Beladung mit Cholin schneller ist als unbeladen. Hohe Transportraten für Cholin, Dopamin und TMA sprechen dafür, dass diese organischen Kationen den Transport von weniger gut transportierten Kationen wie TEA transstimulieren können, aber nicht umgekehrt. Dafür spricht auch die relativ geringe Spannungsabhängigkeit des TEA-Transports. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, warum in anderen Studien manche organische Kationen den Transport anderer entweder transstimulieren oder transinhibieren konnten.

In jedem Fall haben die in dieser Arbeit durchgeführten Transstimulationsexperimente mit der amperometrischen Spannungsklemme gezeigt, dass die Transstimulation stark vom Membranpotenzial und wahrscheinlich auch von weiteren Parametern wie der Art des transportierten Ions und seiner Konzentration abhängig ist, so dass es nicht verwundert, dass die in der Literatur beschriebenen Transstimulationsexperimente ohne Kontrolle über das Membranpotenzial zu widersprüchlichen Ergebnissen führten.

## 4.7 Ausblick

Die Untersuchung des Transporters für organische Kationen rOCT2 in Membranpatchen und mit der amperometrischen Spannungsklemme konnte in nicht unerheblichem Maße zu seiner Charakterisierung beitragen und lieferte schon ein erstes Transportmodell. Einige die Charakterisierung von rOCT2 in „inside out“-Patchen betreffende Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht (Budiman *et al.* 2000a) und auf internationalen Konferenzen präsentiert (Budiman *et al.* 2000b; Budiman *et al.* 2000c). Andere Ergebnisse über den Mechanismus der Inhibierung rOCT2-vermittelter Ströme durch Chinin sind Teil einer kürzlich vom *American Journal of Physiology* zur Veröffentlichung angenommenen Arbeit (Arndt *et al.* 2001). Eine weitere Veröffentlichung ist in Vorbereitung, in der die mit der amperometrischen Spannungsklemme erzielten Ergebnisse präsentiert werden sollen.

Für eine Identifizierung einzelner Ladungstransferschritte und für die Bestimmung von Ratenkonstanten sind stationäre Messungen jedoch nicht ausreichend. Es ist eine Herausforderung, mittels Vor-Gleichgewichtsmessungen mit Spannungs- oder Konzentrationssprüngen das vorgeschlagene Modell weiter zu verfeinern (Nakao und Gadsby 1986; Fendler *et al.* 1987; Friedrich und Nagel 1997). Dazu ist es allerdings notwendig, höhere elektrische Ströme im Patch zu erzielen. Dies könnte zum Beispiel durch eine Steigerung der Expression von rOCT2 in Oozyten erreicht werden. Derzeit wird versucht, den Expressionslevel von rOCT2 mit dem von rOCT1 zu vergleichen. Dazu werden beide Proteine jeweils mit einem Bacteriorhodopsin-Molekül (Nagel *et al.* 1995) fusioniert, um die OCT-vermittelten Ströme mit den photo-induzierten Strömen des Bacteriorhodopsins zu eichen.

Ein weiterer Ansatz, der Informationen über Bindung und Transport von organischen Kationen durch Transporter für organische Kationen liefern könnte, ist die elektrophysiologische Charakterisierung von Transportern, in die gezielt Mutationen eingebracht werden. In rOCT1 wurde mit der Mutation des Aspartats 475 eine Stelle gefunden, die bei dem Transport von organischen Kationen beteiligt sein könnte (Gorboulev *et al.* 1999). Eine Mutation des entsprechenden Aspartats in rOCT2 könnte vielversprechend für weitergehende Studien an rOCT2 sein.

## 5 Zusammenfassung der Dissertation

Membranproteine der renalen Bürstensaumzellen spielen eine wichtige Rolle beim Transport von organischen Kationen in der Niere. Mit der ersten Klonierung eines Transporters für organische Kationen wurden die Grundlagen für eine Aufklärung der Transportvorgänge auf molekularer Ebene gelegt. Der Transportmechanismus und die physiologische Funktion des in den Plasmamembranen von Niere und Gehirn exprimierten Transporters für organische Kationen 2 (OCT2) werden zur Zeit – teilweise kontrovers – diskutiert.

In dieser Dissertation wurde der aus der Rattenniere klonierte elektrogene Transporter für organische Kationen rOCT2 nach heterologer Expression in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* mit elektrophysiologischen Methoden charakterisiert. Zur Anwendung kam neben der konventionellen Zwei-Elektroden-Spannungsklemme vor allem die „giant patch clamp“-Technik. Als neue Methode speziell für Transstimulationsexperimente bei geklemmtem Membranpotenzial wurde die amperometrische Spannungsklemme entwickelt, mit der ein Ausstrom von Dopamin aus vorinkubierten Oozyten mittels Oxidation an einer Carbonfaser-Elektrode bei gleichzeitiger Aufzeichnung des elektrischen Transmembranstromes gemessen werden kann.

Die Kontrolle der physiologischen Salzlösungen beiderseits der Membran in „patch clamp“-Experimenten erlaubte eine leichte Unterscheidung wechselwirkender Substanzen in Substrate wie: Cholin, Dopamin, Tetramethylammonium und Tetraethylammonium und Hemmstoffe wie: Chinin und Tetrabutylammonium (TBA). Anhand von substratinduzierten elektrischen Ausströmen konnten erstmalig für einen Transporter für organische Kationen apparente Substrataffinitäten von der zytoplasmatischen Seite bestimmt werden. Sie liegen in derselben Größenordnung wie zuvor auf der extrazellulären Seite bestimmte Affinitäten. Der schon früher vorgeschlagene elektrogene Ausstrom von Substrat auch gegen ein negatives Membranpotenzial wurde damit bestätigt. Es wurde eine Hemmung rOCT2-vermittelter Ströme durch Schwermetalle und durch Isobutylmethylxanthin gefunden. Die zytoplasmatische Zugabe der Inhibitoren TBA und Chinin hemmte sowohl substratinduzierte Einwärts- als auch Auswärtsströme. Die Inhibierung der Auswärtsströme erfolgte dabei kompetitiv. Von der extrazellulären Seite aus hemmte Chinin im Gegensatz zu TBA Einwärtsströme nichtkompetitiv, was auf eine Transinhibierung nach einer unspezifischen Membranpassage des Chinins hindeutet. Die Analyse von Strom-Spannungskennlinien zeigte, dass die maximalen Transportraten und apparenten Affinitäten der Substrate

spannungsabhängig sind. Umkehrpotenziale, die in Anwesenheit von Substrat beiderseits der Membran gemessen wurden, lagen bei den durch die Nernstgleichung vorhergesagten Werten. Dieses Ergebnis identifiziert das elektrochemische Potenzial als treibende Kraft für den Transport von organischen Kationen bei neutralem pH und schließt die Existenz eines elektroneutralen Organische-Kationen/Protonen-Austauschmodus aus.

Die rOCT2-spezifische Leitfähigkeit war bei sättigenden Konzentrationen von organischen Kationen beiderseits der Membran im Vergleich zu halbsättigenden reduziert. Diese Beobachtung ist mit einem zyklischen Transportmodell erklärbar, bei dem der Transporter nach erfolgtem Transport eines organischen Kations entweder als leerer Transporter oder mit einem auf der anderen Seite gebundenen Kation in seine Ausgangstellung zurückkehren kann, wobei die Translokation der Bindungsdomäne jeweils mit einer Konformationsänderung des Transporters einhergeht. Der Austausch von organischen Kationen erfolgt dabei elektroneutral. Einen weiteren Beleg für einen elektroneutralen Austauschmodus für organische Kationen liefern amperometrische Messungen an reversibel mit Dopamin beladbaren Oozyten. Es konnte ein rOCT2-vermittelter, durch Chinin hemmbarer Dopaminausstrom gemessen werden, der in Abhängigkeit des Membranpotenzials durch extrazelluläres Cholin entweder transstimulierbar oder transinhibierbar war.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen belegen, dass rOCT2 als basolateral lokalisierter Transporter hervorragend dazu geeignet ist, mit der vom elektrochemischen Potenzial getriebenen Substrataufnahme in die Bürstensaumzellen den ersten Schritt der Sekretion von organischen Kationen durch die Niere zu leisten. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass rOCT2 bei einem ausreichenden Konzentrationsgradienten von Cholin bei der physiologisch bedeutsamen Reabsorption von Cholin beteiligt sein könnte, indem dieses gegen das negative Membranpotenzial, womöglich im Austausch gegen ein anderes organisches Kation, transportiert wird. Zeitaufgelöste Messungen mit Substrat- oder Spannungssprüngen sowie Bindungs- und Transportstudien nach gezielter Mutagenese könnten zukünftig einer weiteren Aufklärung des Transportmechanismus dienen. Einige die Charakterisierung von rOCT2 in „inside out“-Patchen betreffende Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht und auf internationalen Konferenzen präsentiert. Andere Ergebnisse sind Teil einer vom *American Journal of Physiology* zur Veröffentlichung angenommenen Arbeit und eine weitere Veröffentlichung ist in Vorbereitung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Acara, M. (1975). The kidney in regulation of plasma choline in the chicken. *American Journal of Physiology* **228**(2): 645-649.
- Acara, M. und Rennick, B. (1973). Regulation of plasma choline by the renal tubule: bidirectional transport of choline. *American Journal of Physiology* **225**(5): 1123-1128.
- Acara, M., Roch-Ramel, F. und Rennick, B. (1979). Bidirectional renal tubular transport of free choline: a micropuncture study. *American Journal of Physiology* **236**(2): F112-118.
- Adams, R. G., Harrison, J. F. und Scott, P. (1969). Development of Cadmium-Induced Proteinuria, Impaired Renal Function, and Osteomalacia in Alkaline Battery Workers. *Quarterly Journal of Medicine* **38**(152): 425-&.
- Ahn, D. W., Kim, Y. M., Kim, K. R. und Park, Y. S. (1999). Cadmium binding and sodium-dependent solute transport in renal brush-border membrane vesicles. *Toxicology and Applied Pharmacology* **154**(3): 212-218.
- Armstrong-James, M. und Millar, J. (1979). Carbon-Fiber Micro-Electrodes. *Journal of Neuroscience Methods* **1**(3): 279-287.
- Arndt, P. (2000). Klonierung und funktionelle Charakterisierung von organischen Kationentransportern aus der Rattenniere. *Dissertationsschrift*. Würzburg, Bayerische Julius-Maximilians-Universität.
- Arndt, P., Volk, C., Gorboulev, V., Budiman, T., Popp, C., Ulzheimer-Teuber, I., Akhoundova, A., Koppatz, S., Bamberg, E., Nagel, G. *et al.* (2001). Interaction of cations, anions and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*; zur Veröffentlichung angenommen **281**(3): F454-F468.
- Bergeron, M. und Scriver, C. R. (1992). Pathophysiology of Renal Hyperaminoacidurias and Glucosuria. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Seldin, D. W. und Giebisch, G. New York, Raven Press. **3**: 2947-2969.
- Bessegghir, K., Chatton, J. Y. und Roch-Ramel, F. (1990). Transport of the organic cation N1-methylnicotinamide by the rabbit proximal tubule. II. Reabsorption and secretion in the isolated perfused tubule. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **253**(2): 452-460.
- Bessegghir, K., Mosig, D. und Roch-Ramel, F. (1990). Transport of the organic cation N1-methylnicotinamide by the rabbit proximal tubule. I. Accumulation in the isolated nonperfused tubule. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **253**(2): 444-451.
- Bessegghir, K., Pearce, L. B. und Rennick, B. (1981). Renal tubular transport and metabolism of organic cations by the rabbit. *American Journal of Physiology* **241**(3): F308-314.
- Bevan, C. und Kinne, R. K. (1990). Choline transport in collecting duct cells isolated from the rat renal inner medulla. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **417**(3): 324-328.
- Bligh, J. (1952). The Level of Free Choline in Plasma. *Journal of Physiology-London* **117**(2): 234-240.
- Budiman, T., Bamberg, E., Koepsell, H. und Nagel, G. (2000a). Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *Journal of Biological Chemistry* **275**(38): 29413-29420.
- Budiman, T., Bamberg, E., Koepsell, H. und Nagel, G. (2000b). Characterization of an organic cation transporter in giant membrane patches. *Biophysical Society Annual Meeting New Orleans; Biophysical Journal* **78**(1): 289Pos.
- Budiman, T., Bamberg, E., Koepsell, H. und Nagel, G. (2000c). Transport mechanism of the organic cation transporter 2. *54th Annual Meeting of the Society of General Physiologists; Journal of General Physiology* **116**(1): 21a (Abstract).
- Burckhardt, G. und Wolff, N. A. (2000). Structure of renal organic anion and cation transporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **278**(6): F853-F866.
- Busch, A. E., Karbach, U., Miska, D., Gorboulev, V., Akhoundova, A., Volk, C., Arndt, P., Ulzheimer, J. C., Sonders, M. S., Baumann, C. *et al.* (1998). Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Molecular Pharmacology* **54**(2): 342-352.
- Busch, A. E., Quester, S., Ulzheimer, J. C., Gorboulev, V., Akhoundova, A., Waldegger, S., Lang, F. und Koepsell, H. (1996). Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Letters* **395**(2-3): 153-156.



- Busch, A. E., Quester, S., Ulzheimer, J. C., Waldegger, S., Gorboulev, V., Arndt, P., Lang, F. und Koepsell, H. (1996). Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *Journal of Biological Chemistry* **271**(51): 32599-32604.
- Chun, J. K., Zhang, L., Piquette-Miller, M., Lau, E., Tong, L. Q. und Giacomini, K. M. (1997). Characterization of guanidine transport in human renal brush border membranes. *Pharmaceutical Research* **14**(7): 936-941.
- Colman, A. (1984). Translation of Eucariotic Messenger RNA in *Xenopus* Oocytes. *Transcription and Translation: A Practical Approach*. Hames, B. D. und Higgins, S. J. Oxford, IRL Press: 271-302.
- Colman, A., Bhamra, S. und Valle, G. (1984). Post-translational modification of exogenous proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemical Society Transactions* **12**(6): 932-937.
- Dantzler, W. H., Brokl, O. H. und Wright, S. H. (1989). Brush-border TEA transport in intact proximal tubules and isolated membrane vesicles. *American Journal of Physiology* **256**(2 Pt 2): F290-297.
- Dantzler, W. H., Evans, K. K. und Wright, S. H. (1998). Basolateral choline transport in isolated rabbit renal proximal tubules. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **436**(6): 899-905.
- Dantzler, W. H., Wright, S. H., Chatsudhipong, V. und Brokl, O. H. (1991). Basolateral tetraethylammonium transport in intact tubules: specificity and trans-stimulation. *American Journal of Physiology* **261**(3 Pt 2): F386-392.
- David, C., Rumrich, G. und Ullrich, K. J. (1995). Luminal transport system for H<sup>+</sup>/organic cations in the rat proximal tubule. Kinetics, dependence on pH; specificity as compared with the contraluminal organic cation-transport system. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **430**(4): 477-492.
- Doucet, A. (1988). Function and Control of Na-K-ATPase in Single Nephron Segments of the Mammalian Kidney. *Kidney International* **34**(6): 749-760.
- Dudley, A. J. und Brown, C. D. (1996). Mediation of cimetidine secretion by P-glycoprotein and a novel H<sup>+</sup>-coupled mechanism in cultured renal epithelial monolayers of LLC-PK1 cells. *British Journal of Pharmacology* **117**(6): 1139-1144.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* **136**: 153-180.
- Dutt, A., Heath, L. A. und Nelson, J. A. (1994). P-glycoprotein and organic cation secretion by the mammalian kidney. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **269**(3): 1254-1260.
- Fendler, K., Droese, S., Epstein, W., Bamberg, E. und Altendorf, K. (1999). The Kdp-ATPase of *Escherichia coli* mediates an ATP-dependent, K<sup>+</sup>- independent electrogenic partial reaction. *Biochemistry* **38**(6): 1850-1856.
- Fendler, K., Grell, E. und Bamberg, E. (1987). Kinetics of pump currents generated by the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Letters* **224**(1): 83-88.
- Fendler, K., Grell, E., Haubs, M. und Bamberg, E. (1985). Pump Currents Generated By the Purified Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase From Kidney On Black Lipid-Membranes. *Embo Journal* **4**(12): 3079-3085.
- Fisher, A. C. (1996). *Electrode Dynamics*. Oxford, Oxford University Press.
- Ford, J. M. und Hait, W. N. (1990). Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacological Reviews* **42**(3): 155-199.
- Frick, A., Rumrich, G., Ullrich, K. J. und Lassiter, W. E. (1965). Microperfusion study of calcium transport in the proximal tubule of the rat kidney. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **286**(2): 109-117.
- Friedrich, T., Bamberg, E. und Nagel, G. (1996). Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase pump currents in giant excised patches activated by an ATP concentration jump. *Biophysical Journal* **71**(5): 2486-2500.
- Friedrich, T. und Nagel, G. (1997). Comparison of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump currents activated by ATP concentration or voltage jumps. *Biophysical Journal* **73**(1): 186-194.
- Goldin, A. L. (1991). Expression of ion channels by injection of mRNA into *Xenopus* oocytes. *Methods in Cell Biology* **36**: 487-509.
- Gonon, F., Buda, M., Cespuglio, R., Jouvét, M. und Pujol, J. F. (1980). In vivo Electrochemical Detection of Catechols in the Neostriatum of Anesthetized Rats - Dopamine or Dopac. *Nature* **286**(5776): 902-904.
- Gonon, F., Cespuglio, R., Ponchon, J. L., Buda, M., Jouvét, M., Adams, R. N. und Pujol, J. F. (1978). In vivo Electrochemical Determination of Dopamine Release in Rat Neostriatum. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* **286**(16): 1203-1206.

- Gorboulev, V., Ulzheimer, J. C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A. E. und Koepsell, H. (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA and Cell Biology* **16**(7): 871-881.
- Gorboulev, V., Volk, C., Arndt, P., Akhoundova, A. und Koepsell, H. (1999). Selectivity of the polyspecific cation transporter rOCT1 is changed by mutation of aspartate 475 to glutamate. *Molecular Pharmacology* **56**(6): 1254-1261.
- Grewer, C., Watzke, N., Wiessner, M. und Rauen, T. (2000). Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(17): 9706-9711.
- Groves, C. E., Morales, M. N., Gandolfi, A. J., Dantzer, W. H. und Wright, S. H. (1995). Peritubular Paraquat Transport in Isolated Renal Proximal Tubules. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **275**(2): 926-932.
- Grundemann, D., Babinebell, J., Martel, F., Ording, N., Schmidt, A. und Schomig, E. (1997). Primary Structure and Functional Expression of the Apical Organic Cation Transporter From Kidney Epithelial Llc-Pk1 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**(16): 10408-10413.
- Grundemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M. und Koepsell, H. (1994). Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* **372**(6506): 549-552.
- Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. und Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**(5316): 177-182.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F. J. (1981). Improved Patch-Clamp Techniques For High-Resolution Current Recording From Cells and Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **391**(2): 85-100.
- Hansen, U.-P., Gradmann, D., Sanders, D. und Slayman, C. L. (1981). Interpretation of Current-Voltage Relationships for "Active" Ion Transport Systems: I. Steady-State Reaction-Kinetic Analysis of Class-I Mechanisms. *Journal of Membrane Biology* **63**: 165-190.
- Henze, G. und Neeb, R. (1986). *Elektrochemische Analytik*. Heidelberg, Springer.
- Hilgemann, D. W. (1989). Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium- calcium exchange currents. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **415**(2): 247-249.
- Hilgemann, D. W. und Lu, C. C. (1998). Giant membrane patches: improvements and applications. *Methods in Enzymology* **293**: 267-280.
- Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc.
- Holm, J. (1977). Effect of Cations On Tetraethylammonium Exit From Mouse Kidney Cortex Slices. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* **230**(2): 180-189.
- Holohan, P. D. und Ross, C. R. (1980). Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 1. Countertransport studies. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **215**(1): 191-197.
- Holohan, P. D. und Ross, C. R. (1981). Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 2. delta pH studies. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **216**(2): 294-298.
- Homolya, L., Hollo, Z., Germann, U. A., Pastan, I., Gottesman, M. M. und Sarkadi, B. (1993). Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *Journal of Biological Chemistry* **268**(29): 21493-21496.
- Hori, R., Hirai, M., Katsura, T., Takano, M., Yasuhara, M., Kaneko, S. und Satoh, M. (1992). Expression of renal organic cation transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemical Journal* **283**(Pt 2): 409-411.
- Hull, R. N., Cherry, W. R. und Weaver, G. W. (1976). The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* **12**(10): 670-677.
- Inui, K., Masuda, S. und Saito, H. (2000). Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney International* **58**(3): 944-958.
- Inui, K., Saito, H. und Hori, R. (1985). H<sup>+</sup>-Gradient-Dependent Active-Transport of Tetraethylammonium Cation in Apical-Membrane Vesicles Isolated From Kidney Epithelial-Cell Line Llc-Pk1. *Biochemical Journal* **227**(1): 199-203.
- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G. und Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate - Preface. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health* **24 Suppl.** 1: 1-51.
- Jorgensen, P. L. (1986). Structure, Function and Regulation of Na,K-ATPase in the Kidney. *Kidney International* **29**(1): 10-20.

- Karbach, U., Kricke, J., Meyer-Wentrup, F., Gorboulev, V., Volk, C., Loffing-Cueni, D., Kaissling, B., Bachmann, S. und Koepsell, H. (2000). Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Fluid & Electrolyte Physiology* **279**(4): F679-F687.
- Katsura, T., Takano, M., Tomita, Y., Yasuhara, M., Inui, K. und Hori, R. (1993). Characteristics of organic cation transporter in rat renal basolateral membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1146**(2): 197-202.
- Kazantzis, G., Trott, D. G., Spowage, J. S. und Flynn, F. V. (1963). Renal Tubular Malfunction and Pulmonary Emphysema in Cadmium Pigment Workers. *Quarterly Journal of Medicine* **32**(126): 165-&.
- Kekuda, R., Prasad, P. D., Wu, X. A., Wang, H. P., Fei, Y. J., Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (1998). Cloning and Functional Characterization of a Potential-Sensitive, Polyspecific Organic Cation Transporter (Oct3) Most Abundantly Expressed in Placenta. *Journal of Biological Chemistry* **273**(26): 15971-15979.
- Koepsell, H. (1998). Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annual Reviews of Physiology* **60**: 243-266.
- Koepsell, H., Gorboulev, V. und Arndt, P. (1999). Molecular pharmacology of organic cation transporters in kidney. *Journal of Membrane Biology* **167**(2): 103-117.
- Läuger, P. (1991). *Electrogenic Ion Pumps*. Sunderland, MA, USA, Sinauer Associates, Inc.
- Levinsky, N. G. und Lieberthal, W. (1992). Clearance Techniques. *Handbook of Physiology: Section 8: Renal Physiology*. Windhager, E. E. New York, Oxford University Press, Incorporated. **1**: 227-247.
- Marino, M. (1996). Protein Expression in Xenopus Oocytes. *Protein Engineering: Principles and Practice*. Cleland, J. L. und Craik, C. S. New York, Wiley.
- McKinney, T. D. (1982). Heterogeneity of organic base secretion by proximal tubules. *American Journal of Physiology* **243**(4): F404-407.
- McKinney, T. D. und Hosford, M. A. (1993). ATP-stimulated tetraethylammonium transport by rabbit renal brush border membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **268**(10): 6886-6895.
- Mehrens, T., Lelleck, S., Cetinkaya, I., Knollmann, M., Hohage, H., Gorboulev, V., Boknik, P., Koepsell, H. und Schlatter, E. (2000). The affinity of the organic cation transporter rOCT1 is increased by protein kinase C-dependent phosphorylation. *Journal of the American Society of Nephrology* **11**(7): 1216-1224.
- Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S. und Sakmann, B. (1986). Patch clamp measurements on Xenopus laevis oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **407**(6): 577-588.
- Miledi, R. (1982). A Calcium-Dependent Transient Outward Current in Xenopus-Laevis Oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **215**(1201): 491-497.
- Miller, A. J. und Zhou, J. J. (2000). Xenopus oocytes as an expression system for plant transporters. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**(1-2): 343-358.
- Miyamoto, Y., Tiruppathi, C., Ganapathy, V. und Leibach, F. H. (1989). Multiple transport systems for organic cations in renal brush-border membrane vesicles. *American Journal of Physiology* **256**(4 Pt 2): F540-548.
- Nagel, G. (1999). Differential function of the two nucleotide binding domains on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochimica et Biophysica Acta* **1461**(2): 263-274.
- Nagel, G., Mockel, B., Buldt, G. und Bamberg, E. (1995). Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping. *FEBS Letters* **377**(2): 263-266.
- Nagel, G., Szellas, T., Riordan, J. R., Friedrich, T. und Hartung, K. (2001). Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel. *Embo Reports* **2**(3): 249-254.
- Nagel, G., Volk, C., Friedrich, T., Ulzheimer, J. C., Bamberg, E. und Koepsell, H. (1997). A reevaluation of substrate specificity of the rat cation transporter rOCT1. *Journal of Biological Chemistry* **272**(51): 31953-31956.
- Nakao, M. und Gadsby, D. C. (1986). Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump. *Nature* **323**(6089): 628-630.
- Notterman, D. A., Drayer, D. E., Metakis, L. und Reidenberg, M. M. (1986). Stereoselective renal tubular secretion of quinidine and quinine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **40**(5): 511-517.
- Okuda, M., Saito, H., Urakami, Y., Takano, M. und Inui, K. (1996). cDNA cloning and functional expression of a novel rat kidney organic cation transporter, OCT2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **224**(2): 500-507.

- Okuda, M., Urakami, Y., Saito, H., Inui, K., inui@kuhp, kyoto, u., ac und jp (1999). Molecular mechanisms of organic cation transport in OCT2-expressing *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1417**(2): 224-231.
- Orlowski, J., Kandasamy, R. A. und Shull, G. E. (1992). Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *Journal of Biological Chemistry* **267**(13): 9331-9339.
- Pan, B. F., Sweet, D. H., Pritchard, J. B., Chen, R. und Nelson, J. A. (1999). A transfected cell model for the renal toxin transporter, rOCT2. *Toxicological Sciences* **47**(2): 181-186.
- Peters, L. (1960). Renal Tubular Excretion of Organic Bases. *Pharmacological Reviews* **12**(1): 1-35.
- Pritchard, J. B. und Miller, D. S. (1992). Proximal tubular transport of organic anions and cations. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Seldin, D. W. und Giebisch, G. New York, Raven Press. **3**: 2921-2945.
- Pritchard, J. B. und Miller, D. S. (1996). Intracellular compartmentation of organic anions and cations during renal secretion. *Cellular Physiology and Biochemistry* **6**(1-2): 50-59.
- Pritchard, J. B. und Miller, D. S. (1997). Renal secretion of organic cations: A multistep process. *Advanced Drug Delivery Reviews* **25**(2-3): 231-242.
- Pritchard, J. B., Sykes, D. B., Walden, R. und Miller, D. S. (1994). ATP-dependent transport of tetraethylammonium by endosomes isolated from rat renal cortex. *American Journal of Physiology* **266**(6 Pt 2): F966-976.
- Quebbemann, A. J. und Rennick, B. R. (1968). Catechol transport by the renal tubule in the chicken. *American Journal of Physiology* **214**(5): 1201-1204.
- Rafizadeh, C., Manganel, M., Roch-Ramel, F. und Schali, C. (1986). Transport of organic cations in brush border membrane vesicles from rabbit kidney cortex. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **407**(4): 404-408.
- Rajan, P. D., Kekuda, R., Chancy, C. D., Huang, W., Ganapathy, V., Smith, S. B., sbsmith@mail, mcg und edu (2000). Expression of the extraneuronal monoamine transporter in RPE and neural retina. *Current Eye Research* **20**(3): 195-204.
- Rennick, B. R. (1981). Renal tubule transport of organic cations. *American Journal of Physiology* **240**(2): F83-89.
- Rennick, B. R., Moe, G. K., Lyons, R. H., Hoobler, S. W. und Neligh, R. (1947). Absorption and renal excretion of the tetraethylammonium ion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **91**: 210-217.
- Riordan, J. R. (1993). The Cystic-Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Annual Review of Physiology* **55**: 609-630.
- Roch-Ramel, F., Besseghir, K. und Murer, H. (1992). Renal excretion and tubular transport of organic anions and cations. *Handbook of Physiology: Section 8: Renal Physiology*. Windhager, E. E. New York, Oxford University Press, Inc. **48**: 2189-2262.
- Roels, H. A., Hoet, P. und Lison, D. (1999). Usefulness of biomarkers of exposure to inorganic mercury, lead, or cadmium in controlling occupational and environmental risks of nephrotoxicity. *Renal Failure* **21**(3-4): 251-262.
- Sauer, G. A., Nagel, G., Koepsell, H., Bamberg, E. und Hartung, K. (2000). Voltage and substrate dependence of the inverse transport mode of the rabbit Na(+)/glucose cotransporter (SGLT1). *FEBS Letters* **469**(1): 98-100.
- Schali, C., Schild, L., Overney, J. und Roch-Ramel, F. (1983). Secretion of tetraethylammonium by proximal tubules of rabbit kidneys. *American Journal of Physiology* **245**(2): F238-246.
- Seifert, B., Becker, K., Helm, D., Krause, C., Schulz, C. und Seiwert, M. (2000). The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): reference concentrations of selected environmental pollutants in blood, urine, hair, house dust, drinking water and indoor air. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **10**(6): 552-565.
- Seldin, D. W. und Giebisch, G., Eds. (1992). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. New York, Raven Press.
- Sherman-Gold, R., Ed. (1993). *The Axon Guide for Electrophysiology & Biophysics Laboratory Techniques*. Foster City, CA, USA, Axon Instruments, Inc.
- Sigel, E. (1990). Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *Journal of Membrane Biology* **117**(3): 201-221.
- Sokol, P. P. und McKinney, T. D. (1990). Mechanism of organic cation transport in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *American Journal of Physiology* **258**(6 Pt 2): F1599-1607.

- Soreq, H. (1985). The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **18**(3): 199-238.
- Soreq, H. und Seidman, S. (1992). *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods in Enzymology* **207**: 225-265.
- Sperber, I. (1946). A New Method For the Study of Renal Tubular Excretion in Birds. *Nature* **158**(4004): 131-131.
- Sperber, I. (1947). The mechanism of renal excretion of some detoxication products in the chicken. *Proc. Int. Congr. Physiol.* **17**: 217-218.
- Sugawara-Yokoo, M., Urakami, Y., Koyama, H., Fujikura, K., Masuda, S., Saito, H., Naruse, T., Inui, K. und Takata, K. (2000). Differential localization of organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 in the basolateral membrane of rat kidney proximal tubules [In Process Citation]. *Histochemistry and Cell Biology* **114**(3): 175-180.
- Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J. S., Richards, B. M. und Barnard, E. A. (1981). Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* **292**(5826): 862-864.
- Sweet, D. H., Miller, D. S. und Pritchard, J. B. (2000). Basolateral localization of organic cation transporter 2 in intact renal proximal tubules. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **279**(5): F826-F834.
- Sweet, D. H. und Pritchard, J. B. (1999). rOCT2 is a basolateral potential-driven carrier, not an organic cation/proton exchanger. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **277**(6 Pt 2): F890-898.
- Takano, M., Inui, K., Okano, T., Saito, H. und Hori, R. (1984). Carrier-mediated transport systems of tetraethylammonium in rat renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **773**(1): 113-124.
- Taylor, M. A., Johnson, A. D. und Smith, L. D. (1985). Growing *Xenopus* oocytes have spare translational capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(19): 6586-6589.
- Ullrich, K. J. (1997). Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *Journal of Membrane Biology* **158**(2): 95-107.
- Ullrich, K. J., Baumann, K., Loeschke, K., Rumrich, G. und Stolte, H. (1966). Micropuncture experiments with saluretic sulfonamides. *Annals of the New York Academy of Sciences* **139**(2): 416-423.
- Ullrich, K. J. und Greger, R. (1985). Approaches to the study of tubule transport function. *The kidney: physiology and pathophysiology*. Seldin, D. W. und Giebisch, G. New York, Raven Press. **1**: 427-469.
- Ullrich, K. J. und Rumrich, G. (1992). Renal contraluminal transport systems for organic anions (paraaminohippurate, PAH) and organic cations (N1-methyl-nicotinamide, NMeN) do not see the degree of substrate ionization. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **421**(2-3): 286-288.
- Ullrich, K. J. und Rumrich, G. (1996). Luminal transport system for choline<sup>+</sup> in relation to the other organic cation transport systems in the rat proximal tubule. Kinetics, specificity: alkyl/aryl amines, alkyl amines with OH, O, SH, NH<sub>2</sub>, ROCO, RSCO and H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-groups, methylaminostyryl, rhodamine, acridine, phenanthrene and cyanine compounds. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **432**(3): 471-485.
- Urakami, Y., Nakamura, N., Takahashi, K., Okuda, M., Saito, H., Hashimoto, Y. und Inui, K. (1999). Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 rat kidney. *FEBS Letters* **461**(3): 339-342.
- Urakami, Y., Okuda, M., Masuda, S., Saito, H. und Inui, K. I. (1998). Functional Characteristics and Membrane Localization of Rat Multispecific Organic Cation Transporters, Oct1 and Oct2, Mediating Tubular Secretion of Cationic Drugs. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **287**(2): 800-805.
- Urakami, Y., Okuda, M., Saito, H. und Inui, K. (2000). Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Letters* **473**(2): 173-176.
- Van der Donk, J. A. (1975). Translation of plant messengers in egg cells of *Xenopus laevis*. *Nature* **256**(5519): 674-675.
- Vasilets, L. A., Schmalzing, G., Madefessel, K., Haase, W. und Schwarz, W. (1990). Activation of protein kinase C by phorbol ester induces downregulation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis*. *Journal of Membrane Biology* **118**(2): 131-142.
- Velazquez, H. und Wright, F. S. (1992). Renal Micropuncture Techniques. *Handbook of Physiology: Section 8: Renal Physiology*. Windhager, E. E. New York, Oxford University Press, Inc. **1**: 249-269.
- Weinreich, F., Riordan, J. R. und Nagel, G. (1999). Dual effects of ADP and adenylylimidodiphosphate on CFTR channel kinetics show binding to two different nucleotide binding sites. *Journal of General Physiology* **114**(1): 55-70.

- Weinreich, F., Wood, P. G., Riordan, J. R. und Nagel, G. (1997). Direct action of genistein on CFTR. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **434**(4): 484-491.
- Wright, S. H. (1996). Characterization of renal brush-border and basolateral membrane transporters for organic cations. *Cellular Physiology and Biochemistry* **6**(1-2): 112-122.
- Wright, S. H., Wunz, T. M. und Wunz, T. P. (1992). A Choline Transporter in Renal Brush-Border Membrane-Vesicles - Energetics and Structural Specificity. *Journal of Membrane Biology* **126**(1): 51-65.
- Zhang, L., Brett, C. M. und Giacomini, K. M. (1998). Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **38**: 431-460.
- Zhang, L., Gorset, W., Dresser, M. J. und Giacomini, K. M. (1999). The interaction of n-tetraalkylammonium compounds with a human organic cation transporter, hOCT1. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **288**(3): 1192-1198.
- Zhu, G. Y., Zhang, Y., Xu, H. X. und Jiang, C. (1998). Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *Journal of Neuroscience Methods* **81**(1-2): 73-83.

# Häufig benutzte Symbole und Abkürzungen

## *Abkürzungen von chemischen Substanzen und biochemischen Namen*

Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CdCl <sub>2</sub>	Cadmiumchlorid
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CH	Cholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-Tetraessigsäure
[I]	Inhibitorkonzentration
[S]	Substratkonzentration
ext	extrazellulär
in	zytoplasmatisch
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>0,5</sub>	apparente Bindungskonstante
K <sub>i</sub>	apparente Inhibierungskonstante
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MPP	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
Na/K-ATPase	Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase
NaCl	Natriumchlorid
NMG	D(-)-N-Methylglucamin
NMN	N-Methylnikotinamid
OC <sup>+</sup>	organisches Kation
OCT	Transporter für organische Kationen
ORi	modifizierte Oozyten-Ringerlösung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Q	Chinin
TBA	Tetrabutylammonium
TEA	Tetraethylammonium
r	aus der Ratte kloniert
I <sub>max</sub>	maximale Transportrate
TMA	Tetramethylammonium
TPA	Tetrapropylammonium

**Abkürzungen von Wörtern**

"i/o"	"inside out"
"I/V"	"Strom/Spannung"
"o/o"	"outside out"
Abb.	Abbildung

**Allgemeine Formelzeichen**

C	Kapazität
F	Faradaykonstante
G	Leitfähigkeit
I	Strom
ln	natürlicher Logarithmus
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK	Dissoziations-Gleichgewichtskonstante
R	allgemeine Gaskonstante
R	Widerstand
t	Zeit
T	absolute Temperatur
RC	Zeitkonstante aus Widerstand mal Kapazität
U	Spannung
z	Ionenvaleanz

**Physikalische Maße und Einheiten**

F	Farad
A	Ampere
%	Prozent
°C	Grad Celsius
l	Liter
M	molar (mol/liter)
g	Gramm
Hz	Hertz
m	Meter
min	Minute
s	Sekunde
$\Omega$	Ohm
V	Volt

**Vorsätze für Vielfache und Teile von Einheiten**

G	Giga
M	Mega
k	Kilo
c	Centi
m	Milli
$\mu$	Mikro
n	Nano
p	Pico



## Danksagung

Während der Anfertigung dieser Dissertation am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt wurde ich von meinen Kollegen tatkräftig und mit guten Ratschlägen begleitet. Mein ganz besonderer Dank gilt Privatdozent Dr. Georg Nagel, der meine Arbeit mit richtungsweisenden Ideen, Verbesserungsvorschlägen und kleinen Tricks und Kniffen aus dem Laboralltag betreut hat und mir half, gesteckte Ziele nicht aus den Augen zu verlieren. Prof. Dr. Ernst Bamberg möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion, die interessante Themenstellung und für seine jederzeitige Bereitschaft zu einem kollegialen oder väterlichen Gespräch ganz herzlich danken.

Prof. Dr. Hermann Koepsell danke ich für die Bereitstellung von Plasmid-DNA des von mir untersuchten Proteins und die gute Zusammenarbeit.

Ohne die Unterstützung von Frau Doris Ollig bei allen molekularbiologischen Arbeiten und von Frau Dagmar Stiegert bei der Pflege der Frösche, der Unterhaltung der Labore und am Messplatz für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wäre das praktische Arbeiten gar nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Tanjef Szellas und Bettina Himmel möchte ich für zahlreiche Diskussionen und schnelle Hilfe bei jeglichen Problemen danken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich gegenüber den Mitgliedern der „Teerunde“ Ana Bicho, Dr. Ron Clarke, Dr. Christof Grewer, Bettina Himmel, Barbara Legrum, Christian Lüpfer, Maarten Ruitenbergh, Gudrun Sauer und Natalie Watzke aussprechen, für unzählige Gespräche, die nur manchmal etwas mit der Arbeit zu tun hatten und für das leckere Teegebäck.

Allen anderen Kollegen, durch die ich mich immer sehr wohl in dieser Arbeitsgruppe gefühlt habe, möchte ich hiermit für ihre vielfältige Hilfe und Unterstützung danken.

Dr. Frank Weinreich danke ich für die nach Feierabend per E-Mail durchgeführten Spiele.

Meine Eltern Gertrud und Dr. Ingo Budiman haben mir erst diese Promotion ermöglicht.

Vielen Dank für eure Unterstützung, Geduld und Liebe! Ebenso danke ich meinen Geschwistern David, Setia und Senian für ihre mir willkommene Ablenkung von der Arbeit. Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner lieben Frau Kerstin, die mir das Leben und Arbeiten in Frankfurt zur Freude gemacht hat. Vielen Dank für alle deine Ratschläge, deine Hilfe, deinen Zuspruch und deine Liebe!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Thomas Budiman  
Geburtsdatum: 22.09.1969  
Geburtsort: Zweibrücken  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet mit Kerstin Budiman, geb. Haupt

## Schul Ausbildung

1975-1979 Grundsschulen in Emmerich-Hüthum und Bingen Stadt  
1979-1988 Staatliches Stefan-George-Gymnasium Bingen am Rhein  
7/1988 Abitur (Note 1,4)

## Wehrdienst

10/1988-12/1989 Raketenartilleriebataillon 350 in Montabaur

## Hochschulausbildung

10/1990 - 3/1997 Studium der Physik an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz  
Studienschwerpunkte: angewandte Physik, Atomphysik, Biophysik und physikalische Chemie

8/1991 Vordiplom (Note „gut“) in den Fächern theoretische Physik, Experimentalphysik, Mathematik und Chemie

4/1996 – 9/1996 Förderstipendium der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

10/1996 - 3/1997 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema „Bau einer Laser-Ionenquelle mit gepulster Extraktion“ unter Anleitung von Prof. Dr. Gerhard Huber

3/1997 Abschluss des Studiums mit dem Diplom (Note „sehr gut“) in den Fächern theoretische Physik (Prof. Dr. Schilling), Experimentalphysik (Prof. Dr. Reichert), physikalische Chemie (Prof. Dr. Schreiber) und angewandte Physik (Prof. Dr. Backe und Prof. Dr. Egelhof)

ab 8/1997 Promotionsstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main im Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften

Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main bei Prof. Dr. Ernst Bamberg und Privatdozent Dr. Georg Nagel

Thema der Dissertation: Elektrophysiologische Charakterisierung des Transporters für organische Kationen rOCT2